



PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類6 C12N 15/54, 9/12, 15/31, C07K 14/195, C12P 21/02 // (C12N 15/54, C12R 1:01) (C12N 9/12, C12R 1:19) (C12N 15/31, C12R 1:01) (C12P 21/02, C12R 1:19)</p>	A1	<p>(11) 国際公開番号 WO99/00506</p> <p>(43) 国際公開日 1999年1月7日(07.01.99)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP98/02845</p> <p>(22) 国際出願日 1998年6月24日(24.06.98)</p> <p>(30) 優先権データ</p> <p>特願平9/187496 1997年6月26日(26.06.97) JP</p> <p>特願平9/320692 1997年11月21日(21.11.97) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 資酒造株式会社(TAKARA SHUZO CO., LTD.)(JP/JP) 〒612-8061 京都府京都市伏見区竹中町609番地 Kyoto, (JP)</p> <p>(72) 発明者; および</p> <p>(75) 発明者/出願人 (米国についてののみ)</p> <p>上森隆司(UEMORI, Takashi)(JP/JP) 〒520-2141 滋賀県大津市大江三丁目1-16-709 Shiga, (JP)</p> <p>佐藤好美(SATO, Yoshimi)(JP/JP) 〒520-3031 滋賀県栗太郡栗東町大字縄390-7-C-1010 Shiga, (JP)</p> <p>藤田朋子(FUJITA, Tomoko)(JP/JP) 〒569-1144 大阪府高槻市大畑町25-10 Osaka, (JP)</p> <p>三宅一恵(MIYAKE, Kazue)(JP/JP) 〒611-0011 京都府宇治市五ヶ庄三番割34-7 Kyoto, (JP)</p>		<p>向井博之(MUKAI, Hiroyuki)(JP/JP) 〒524-0102 滋賀県守山市水保町字南川1461-82 Shiga, (JP)</p> <p>浅田起代蔵(ASADA, Kiyozo)(JP/JP) 〒520-3333 滋賀県甲賀郡甲南町希望ヶ丘3-20-9 Shiga, (JP)</p> <p>加藤郁之進(KATO, Ikunoshin)(JP/JP) 〒611-0028 京都府宇治市南陵町1-1-150 Kyoto, (JP)</p> <p>(74) 代理人 弁理士 細田芳徳(HOSODA, Yoshinori) 〒540-0012 大阪府大阪市中央区谷町二丁目8番1号 大手前M2ビル 細田国際特許事務所 Osaka, (JP)</p> <p>(81) 指定国 AU, CA, CN, JP, KR, MX, US, VN, ユーラシア 特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>
<p>(54)Title: DNA POLYMERASE-RELATED FACTORS</p> <p>(54)発明の名称 DNAポリメラーゼ関連因子</p> <p>(57) Abstract</p> <p>A thermostable DNA polymerase-related factor promoting the DNA synthesizing activities of DNA polymerases; a thermostable DNA polymerase-related factor having the activity of binding to DNA polymerases and a process for producing the same; genes encoding the above DNA polymerase-related factors; a method for synthesizing DNAs wherein DNA polymerases are used in the presence of the above DNA polymerase-related factors; and kits containing the above DNA polymerase-related factors. Use of these DNA polymerase-related factors makes it possible to provide DNA synthesis systems and DNA amplification systems <i>in vitro</i> which are superior to the conventional ones.</p>		

(57)要約

本発明は、DNAポリメラーゼの有するDNA合成活性を促進する耐熱性のDNAポリメラーゼ関連因子、DNAポリメラーゼに結合する活性を有する耐熱性のDNAポリメラーゼ関連因子及びその製造方法、前記DNAポリメラーゼ関連因子をコードする遺伝子、前記DNAポリメラーゼ関連因子の存在下に、DNAポリメラーゼを使用するDNAの合成方法並びに前記DNAポリメラーゼ関連因子を含有するキットに関する。本発明により、本発明のDNAポリメラーゼ関連因子を利用することにより、従来より優れた試験管内DNA合成及びDNA増幅系が提供する。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AL	アルバニア	FI	フィンランド	LK	スリ・ランカ	SI	スロヴェニア
AM	アルメニア	FR	フランス	LR	リベリア	SK	スロヴァキア
AT	オーストリア	GA	ガボン	LS	レソト	SL	シエラ・レオネ
AU	オーストラリア	GB	英国	LT	リトアニア	SN	セネガル
AZ	アゼルバイジャン	GD	グレナダ	LU	ルクセンブルグ	SZ	スワジランド
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	TD	チャード
BB	バルバドス	GH	ガーナ	MC	モナコ	TG	トーゴ
BE	ベルギー	GM	ガンビア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BF	ブルキナ・ファソ	GN	ギニア	MG	マダガスカル	TM	トルクメニスタン
BG	ブルガリア	GW	ギニア・ビサウ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TR	トルコ
BJ	ベナン	GR	ギリシャ		共和国	TT	トリニダード・トバゴ
BR	ブラジル	HR	クロアチア	ML	マリ	UA	ウクライナ
BY	ベラルーシ	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	UG	ウガンダ
CA	カナダ	ID	インドネシア	MR	モーリタニア	US	米国
CF	中央アフリカ	IE	アイルランド	MW	マラウイ	UZ	ウズベキスタン
CG	コンゴ	IL	イスラエル	MX	メキシコ	VN	ヴェトナム
CH	スイス	IN	インド	NE	ニジェール	YU	ユーゴスラビア
CI	コートジボアール	IS	アイスランド	NL	オランダ	ZW	ジンバブエ
CM	カメルーン	IT	イタリア	NO	ノールウェー		
CN	中国	JP	日本	NZ	ニュージーランド		
CU	キューバ	KE	ケニア	PL	ポーランド		
CY	キプロス	KG	キルギスタン	PT	ポルトガル		
CZ	チェコ	KP	北朝鮮	RO	ルーマニア		
DE	ドイツ	KR	韓国	RU	ロシア		
DK	デンマーク	KZ	カザフスタン	SD	スーダン		
EE	エストニア	LC	セントルシア	SE	スウェーデン		
ES	スペイン	LI	リヒテンシュタイン	SG	シンガポール		

明 細 書

DNAポリメラーゼ関連因子

技術分野

本発明は、DNAポリメラーゼ関連因子に関する。さらに詳しくは、遺伝子工学用試薬として有用なDNAポリメラーゼ関連因子及びその製造方法、さらにそれをコードする遺伝子等に関する。

背景技術

DNAポリメラーゼは遺伝子工学用試薬として有用な酵素であり、DNA塩基配列決定、DNAの標識、部位特異的変異導入などに広く利用されている。また、最近ではポリメラーゼ チェーン リアクション (PCR) 法の開発により、耐熱性DNAポリメラーゼが注目を集め、PCR法に適した種々のDNAポリメラーゼが開発され、商品化されている。

現在知られているDNAポリメラーゼは、そのアミノ酸配列の共通性から大きく4つのファミリーに分類することができ、中でもファミリーA (ポリⅠ型酵素) とファミリーB (α 型酵素) が大多数を占めている。それぞれのファミリーに属するDNAポリメラーゼは、概ね類似した生化学的特性を有しているが、詳細に比較すると個々の酵素によって基質特異性、基質アナログの取込み効率、プライマー伸長性及び伸長速度、DNA合成の様式、エキソヌクレアーゼ活性の付随、温度、pHなどの至適反応条件、阻害剤に対する感受性などについて異なる性質を有している。したがって、これまでは、入手可能なDNAポリメラーゼの中から用途に最も適した性質を有するものを選んで使用してきた。

超好熱性古細菌であるピロコッカス フリオサス (*Pyrococcus furiosus*) は、 α 型に属するDNAポリメラーゼを生産しており、すでにその遺伝子も単離さ

れている [ヌクレイック アシッズ リサーチ (Nucleic Acids Research) 第 21 巻、259-265 頁 (1993)]。

DNA ポリメラーゼには、上記のポル I 型酵素、 α 型酵素などのように、一種の酵素タンパク質のみでその機能を発現するものの他、多数のサブユニットタンパク質からなるオリゴマー酵素が知られている。また、DNA ポリメラーゼとして機能するタンパク質の他に、その機能を調節するタンパク質分子が共存する場合があることも知られている。

発明の開示

本発明の目的は、DNA ポリメラーゼの有する DNA 合成活性を促進する耐熱性の DNA ポリメラーゼ関連因子、及び DNA ポリメラーゼに結合する活性を有する耐熱性の DNA ポリメラーゼ関連因子を提供することにある。

本発明の他の目的は、本発明の DNA ポリメラーゼ関連因子の遺伝子を提供することにある。

本発明のさらに他の目的は、本発明の DNA ポリメラーゼ関連因子の製造方法を提供することにある。

本発明のさらに他の目的は、本発明の DNA ポリメラーゼ関連因子の存在下に、DNA ポリメラーゼを使用する DNA の合成方法を提供することにある。

本発明のさらに他の目的は、本発明の DNA ポリメラーゼ関連因子を含有するキットを提供することにある。

本発明により、本発明の DNA ポリメラーゼ関連因子を利用することにより、従来より優れた試験管内 DNA 合成、ならびに DNA 増幅系が提供される。

最近、これまでに知られている DNA ポリメラーゼとはまったく構造的な類似のない新規な DNA ポリメラーゼが本発明者らによってピロコッカス フリオサスから発見された (国際公開第 97/24444 号パンフレット)。この DNA

ポリメラーゼは2種の新規タンパク質が複合体を形成してDNAポリメラーゼ活性を発現する。また、該酵素は強い3' → 5' エキソヌクレアーゼ活性と優れたプライマー伸長活性とを示し、例えば該酵素をPCRに用いた場合には20 kbもの長さのDNA断片を増幅することが可能である。このピロコッカス フリオサス由来の新規DNAポリメラーゼについては、少なくとも2種のタンパク質が酵素活性に必須の構成要素であるが、これ以外にも該酵素の構成タンパク質が存在するのか、あるいは該酵素の活性に影響を与えるような因子が存在するかどうかは明らかではない。

本発明者らは鋭意研究の結果、上記のピロコッカス フリオサス由来の新規DNAポリメラーゼに結合するタンパク質を単離することに成功した。さらに、その遺伝子をクローニングして、該タンパク質の遺伝子工学的な生産を可能とし、さらに該タンパク質がDNAポリメラーゼの有するDNA合成活性を促進することを見い出した。

本発明の要旨は、

〔1〕 DNAポリメラーゼの有するDNA合成活性を促進する耐熱性のDNAポリメラーゼ関連因子、

〔2〕 DNAポリメラーゼに結合する活性をさらに有する前記〔1〕記載のDNAポリメラーゼ関連因子、

〔3〕 配列表の配列番号：5又は6に示されるアミノ酸配列を有するDNAポリメラーゼ構成タンパク質を含有するDNAポリメラーゼに結合する活性を有する前記〔2〕記載のDNAポリメラーゼ関連因子、

〔4〕 配列表の配列番号：1、3、19、27、34、64、70及び80からなる群より選択された少なくとも1種のアミノ酸配列、又は該アミノ酸配列において、1個以上のアミノ酸が置換、欠失、付加又は挿入されたアミノ酸配列を含有してなる前記〔1〕～〔3〕いずれか記載のDNAポリメラーゼ関連因子、

〔5〕 配列表の配列番号：1、3、19、27、34、64、70及び80か

らなる群より選択された少なくとも1種のアミノ酸配列、又は該アミノ酸配列において、1個以上のアミノ酸が置換、欠失、付加若しくは挿入されたアミノ酸配列を含有し、DNAポリメラーゼの有するDNA合成活性を促進する活性を有するDNAポリメラーゼ関連因子をコードする遺伝子、

〔6〕 配列表の配列番号：2、4、18、26、33、63、69及び79からなる群より選択された塩基配列、又は該塩基配列において、1個以上の塩基が置換、欠失、付加若しくは挿入された塩基配列を含有してなる前記〔5〕記載の遺伝子、

〔7〕 前記〔5〕又は〔6〕記載の遺伝子とハイブリダイズし、かつDNAポリメラーゼの有するDNA合成活性を促進する活性を有するDNAポリメラーゼ関連因子をコードする遺伝子、

〔8〕 前記〔5〕～〔7〕いずれか記載の遺伝子を含有させた形質転換体を培養し、該培養物からDNAポリメラーゼの有するDNA合成活性を促進する耐熱性のDNAポリメラーゼ関連因子を採取する工程を含むことを特徴とする、DNAポリメラーゼ関連因子の製造方法、

〔9〕 前記〔1〕～〔4〕いずれか記載のDNAポリメラーゼ関連因子の存在下にDNAを合成することを特徴とする、DNAポリメラーゼを使用するDNAの合成方法、

〔10〕 2種以上のDNAポリメラーゼ関連因子の存在下にDNAを合成する前記〔9〕記載のDNAの合成方法、

〔11〕 DNAポリメラーゼ関連因子として、F7、PFU-RFC及びPFU-RFCLSの存在下にDNAの合成を行なう前記〔10〕記載のDNA合成方法、

〔12〕 DNAポリメラーゼが、耐熱性DNAポリメラーゼである前記〔9〕～〔11〕いずれか記載のDNAの合成方法、

〔13〕 PCR法により実施される前記〔12〕記載のDNAの合成方法、

〔14〕 試験管内DNA合成に使用されるキットであって、前記〔1〕～〔4〕いずれか記載のDNAポリメラーゼ関連因子及びDNAポリメラーゼを含有してなるキット、

〔15〕 さらにDNA合成反応に必要な試薬を含有してなる前記〔14〕記載のキット、

〔16〕 2種以上のDNAポリメラーゼ関連因子を含有してなる前記〔14〕又は〔15〕記載のキット、

〔17〕 DNAポリメラーゼ関連因子として、F7、PFU-RFC及びPFU-RFCLSを含有してなる前記〔16〕記載のキット、

〔18〕 DNAポリメラーゼとして、耐熱性DNAポリメラーゼを含有してなる前記〔14〕～〔17〕いずれか記載のキット、
に関する。

図面の簡単な説明

第1図は、抗PfuポリメラーゼC抗体カラムにより単離した7種のタンパク質（F1、F2、F3、F4、F5、F6、F7）のSDS-PAGEを示す図である。SDS-PAGE上での分子量はF1～F7の順に約55kDa、24kDa、37kDa、19.5kDa、27kDa、64kDa、33kDaである。

第2図は、F1タンパク質をコードする遺伝子を含むプラスミドpF1-4-10の挿入DNA断片の制限酵素地図を示す図である。

第3図は、F1タンパク質の5'→3'エキソヌクレアーゼ活性を示す図である。

第4図は、F1タンパク質の3'→5'エキソヌクレアーゼ活性を示す図である。

第5図は、F2タンパク質をコードする遺伝子を含むプラスミドpF2172

Nhの挿入DNA断片の制限酵素地図を示す図である。

第6図は、F7タンパク質をコードする遺伝子を含むプラスミドpF7-1-8の挿入DNA断片の制限酵素地図を示す図である。

第7図は、F7タンパク質添加時のDNAポリメラーゼのプライマー伸長活性を示すオートラジオグラムである。

第8図は、F7タンパク質添加時のDNAポリメラーゼのより高分子のプライマー伸長反応物に対するプライマー伸長活性を示すオートラジオグラムである。

第9図は、PFU-RFCタンパク質をコードする遺伝子を含むプラスミドpRFS254NdBの挿入DNA断片の制限酵素地図を示す図である。

第10図は、抗Pfu DNAポリメラーゼ抗体カラムにより分離したタンパク質(F7)のSDS-PAGEの結果を示す図である。SDS-PAGE上でのF7の分子量は約33kDaと推定される。

第11図は、Pfu DNAポリメラーゼ、ならびにPfu DNAポリメラーゼとF7との混合物をゲル濾過して得られた溶出液についてDNAポリメラーゼ活性を測定した結果を示す図である。

第12図は、PFU-RFCLSタンパク質をコードする遺伝子を含むプラスミドpRFLSNhの挿入DNA断片の制限酵素地図である。

第13図は、ピロコッカス フリオサス ゲノムDNA上のF5タンパク質をコードする遺伝子周辺の制限酵素地図を示す図である。

第14図は、抗PFU-RFC抗体カラムにより単離した3種のタンパク質(PFU-RFCLS、PFU-RFC、F7)のSDS-PAGEの結果を示す図である。

第15図は、F7又はRFC-N複合体添加時のDNAポリメラーゼ活性を示すグラフである。

第16図は、PFU-RFCLS及びPFU-RFCをコードする遺伝子を含むプラスミドpRFC10の挿入DNA断片の制限酵素地図を示す図である。

第17図は、F7、又はF7及びrRFC-M複合体添加時のDNAポリメラーゼ活性を示すグラフである。

発明を実施するための最良の形態

1. 本発明のDNAポリメラーゼ関連因子

本明細書において、「DNAポリメラーゼ関連因子」とは、DNAポリメラーゼと共存させることによって、DNAポリメラーゼの機能に影響を与える因子を意味し、具体的にはDNAポリメラーゼの有するDNA合成活性を促進する作用を有する因子、DNAポリメラーゼに結合する活性を有する因子、さらには、両活性を有するもの等を含む。また、本発明のDNAポリメラーゼ関連因子は耐熱性のタンパク質であり、例えば、80℃、15分間の熱処理に対しても安定である。したがって、耐熱性のDNAポリメラーゼを使用した高温条件下でのDNA合成反応にも使用することが可能である。

(a) DNAポリメラーゼの有するDNA合成活性を促進するDNAポリメラーゼ関連因子。

DNAポリメラーゼの有するDNA合成活性を促進するDNAポリメラーゼ関連因子としては、DNAポリメラーゼの有するDNA合成活性を促進するものであれば特に限定されるものではないが、例えば、配列表の配列番号：1、3、19、27、34、64、70及び80からなる群より選ばれた少なくとも1種に示されるアミノ酸配列の全部又は一部を含有するタンパク質、これらの配列に1個以上のアミノ酸が置換、欠失、付加、又は挿入されたアミノ酸配列を含有し、かつDNAポリメラーゼの有するDNA合成活性を促進する活性を有する機能的同等物が挙げられる。本明細書における、「1個以上」とは、1個又は数個若しくはそれ以上の個数をいう。また、「機能的同等物」とは、構造的に差異があっても、その機能や活性について、実質的に同等なものをいい、本発明のDNAポ

リメラーゼ関連因子の範囲内に含まれる。

本発明のDNAポリメラーゼ関連因子がその活性を促進するDNAポリメラーゼとしては特に限定がなく、例えば、耐熱性のDNAポリメラーゼ、特に超好熱菌由来のDNAポリメラーゼが挙げられる。具体的には、ピロコッカス フリオサス由来のDNAポリメラーゼ（後述のP f uポリメラーゼC等）が挙げられる。P f uポリメラーゼCは、後述のように、配列表の配列番号：5及び配列番号：6に示されるアミノ酸配列を有するDNAポリメラーゼ構成タンパク質を含有する酵素である。

また、本発明のDNAポリメラーゼ関連因子は、特定のDNAポリメラーゼの活性のみを促進するものであってもよいが、起源を異にする複数種のDNAポリメラーゼに対してその活性を促進するものが好ましい。

DNAポリメラーゼの有するDNA合成活性を促進する活性を測定する方法としては、DNAポリメラーゼのDNA合成活性測定に通常用いられるものであれば特に限定がない。DNA合成活性を促進する活性は、例えば、新規合成DNA鎖への標識ヌクレオチド取り込み活性の測定を行う際に該因子を添加し、該因子を添加しない場合の活性と比較することにより測定することができる。また、単位時間当たりの新規合成DNA鎖の鎖長やPCRにおける増幅産物量から確認する方法等が挙げられる。前記DNA合成活性測定方法としては、ハーパー アンド ロー社発行、D. R. デービス（D. R. D a v i s）編集のDNAポリメラーゼ フロム エシェリヒア コリ（DNA polymerase from Escherichia coli）第263-276頁（C. C. リチャードソン著）に記載の方法等が挙げられる。

さらに、本発明のDNAポリメラーゼ関連因子は、複数のDNAポリメラーゼ関連因子を併用することにより、単独使用に比べて、共存するDNAポリメラーゼに、より高いDNAポリメラーゼ活性を発揮させることも可能である。

(b) DNAポリメラーゼに結合する活性を有するDNAポリメラーゼ関連因子。

DNAポリメラーゼに結合する活性を有するDNAポリメラーゼ関連因子としては、DNAポリメラーゼに結合する活性を有するものであれば特に限定はない。なお、本明細書におけるDNAポリメラーゼに結合する活性を有するDNAポリメラーゼ関連因子とは、DNAポリメラーゼに直接結合する活性を有するものの他、他の物質、例えば、他のDNAポリメラーゼ関連因子を介して間接的にDNAポリメラーゼに結合する活性を有するものを包含する。例えば、配列表の配列番号：1、3、19、27、34、64、70及び80からなる群より選ばれた少なくとも1種に示されるアミノ酸配列の全部又は一部を含有するタンパク質、これらの配列に1個以上のアミノ酸が置換、欠失、付加又は挿入されたアミノ酸配列を含有し、かつDNAポリメラーゼに結合する活性を有する機能的同等物が挙げられる。本明細書における、「1個以上」とは、1個又は数個若しくはそれ以上の個数をいう。

本発明のDNAポリメラーゼ関連因子が結合するDNAポリメラーゼとしては特に限定がなく、例えば、耐熱性のDNAポリメラーゼ、特に超好熱菌由来のDNAポリメラーゼが挙げられる。具体的には、ピロコッカス フリオサス由来のDNAポリメラーゼ（PfuポリメラーゼC等）が挙げられる。PfuポリメラーゼCに対しては、配列表の配列番号：5、配列番号：6に示されるアミノ酸配列を有するDNAポリメラーゼ構成タンパク質のいずれか又は両方に結合する。

また、本発明のDNAポリメラーゼ関連因子は、特定のDNAポリメラーゼに結合するものであってもよいが、起源を異にする複数種のDNAポリメラーゼに対して結合するものが好ましい。

DNAポリメラーゼへの結合の測定方法としては、該因子とDNAポリメラーゼとを混合し、未変性のゲル電気泳動、ゲル濾過等によって分子量の変化を調べ

る方法、DNAポリメラーゼを固定化した担体への該因子の吸着を調べる方法等が挙げられる。

また、配列表の配列番号：19に示されるアミノ酸配列からなるDNAポリメラーゼ関連因子は、エキソヌクレアーゼ活性を有している。従って、配列番号：19に示されるアミノ酸配列からなるDNAポリメラーゼ関連因子は、DNA複製、DNA修復等のDNAポリメラーゼの作用に関連した機能を有するタンパク質であると考えられる。さらに、前記DNAポリメラーゼ関連因子の機能的同等物として、配列表の配列番号：19に示されるアミノ酸配列の一部、あるいは該配列に1個以上の置換、欠失、付加、又は挿入を有するアミノ酸配列を含有し、DNAポリメラーゼに結合する活性を有し、さらにエキソヌクレアーゼ活性を同様に有するタンパク質等もDNAポリメラーゼ関連因子として本発明の範囲内である。本明細書における、「1個以上」とは、1個又は数個若しくはそれ以上の個数をいう。

なお、本発明のDNAポリメラーゼ関連因子の説明において、配列表の特定の配列番号に示されるアミノ酸配列のそれぞれ全部又は一部を含有するタンパク質と表示したが、ここで「含有するタンパク質」とは、次のようなタンパク質を意味し、これらも本発明の範囲内に含まれる。即ち、遺伝子工学的にタンパク質の生産を行う際には、融合タンパク質として発現させることがしばしば行われる。例えば、目的タンパク質の発現量を増加させるために、N末端に他のタンパク質由来のN末端ペプチド鎖を付加したり、目的タンパク質のN末端又はC末端に適当なペプチド鎖を付加して発現させ、このペプチド鎖に親和性を持つ担体を使用することにより目的タンパク質の精製を容易にしたりする方法などが行われている。本発明においては、前記融合タンパク質も範囲内に含まれる。

2. 本発明のDNAポリメラーゼ関連因子をコードする遺伝子

(a) 本発明のDNAポリメラーゼ関連因子をコードする遺伝子の性質

本発明のDNAポリメラーゼ関連因子をコードする遺伝子としては、前記の本発明のDNAポリメラーゼ関連因子をコードするものであり、DNAあるいはRNAを指す。具体的には、配列表の配列番号：1、3、19、27、34、64、70及び80からなる群より選択された少なくとも1種に示されるアミノ酸配列の全部又はその一部、あるいはそれらの配列において、1個以上のアミノ酸が置換、欠失、付加又は挿入されたアミノ酸配列を含有し、さらにDNAポリメラーゼの有するDNA合成活性を促進する活性、又はDNAポリメラーゼに結合する活性を有するDNAポリメラーゼ関連因子をコードする遺伝子が挙げられる。このような遺伝子としては、具体的には、配列表の配列番号：2、4、18、26、33、63、69及び79からなる群より選択された少なくとも1種に示される塩基配列の全部又はその一部、あるいはそれらの配列において、1個以上の塩基が置換、欠失、付加又は挿入された塩基配列を含有し、DNAポリメラーゼの有するDNA合成活性を促進する活性又はDNAポリメラーゼに結合する活性を有するDNAポリメラーゼ関連因子をコードする遺伝子が挙げられる。本明細書における、「1個以上」とは、1個又は数個若しくはそれ以上の個数をいう。本発明では、さらに、これらの本発明の遺伝子のDNAとハイブリダイズし、かつDNAポリメラーゼの有するDNA合成活性を促進する活性、又はDNAポリメラーゼに結合する活性を有するDNAポリメラーゼ関連因子をコードする遺伝子が挙げられる。

本明細書に記載の「(ある遺伝子に)ハイブリダイズする遺伝子」とは、ある遺伝子のDNAにハイブリダイズすることが可能なDNAからなる遺伝子をいい、該遺伝子に類似した塩基配列を有する遺伝子である。ある遺伝子に類似した塩基配列を有する遺伝子は、そこにコードされているタンパク質のアミノ酸配列、さらに該タンパク質が有している機能も類似している可能性が高い。遺伝子の塩基配列の類似性は、両遺伝子のDNA又はその一部同士がストリンジェントな条件においてハイブリッドを形成する(ハイブリダイズする)かどうかによって調

べることができ、これを利用してある遺伝子がコードするタンパク質と同様の機能を持つタンパク質をコードする遺伝子を取得することができる。すなわち、本発明で得られた遺伝子のDNA又はその一部をプローブに用いて、公知の方法でハイブリダイゼーションを行うことにより、本発明のある遺伝子に類似の塩基配列を有する本発明の他の遺伝子を取得することができる。ハイブリダイゼーションは、例えば1989年、コールド スプリング ハーバー ラボラトリー発行、T. マニアティス (T. Maniatis) ら編集、モレキュラー クローニング：ア ラボラトリー マニュアル第2版 (Molecular Cloning : A Laboratory Manual 2nd ed.) に記載された方法などにより実施することができる。

ここで、「ストリンジェントな条件」とは、非特異的なハイブリダイゼーションが起こらない条件であり、具体的には、例えば、以下の条件があげられる。すなわち、DNAを固定したメンブレンを0.5% SDS、0.1% ウシ血清アルブミン (BSA)、0.1% ポリビニルピロリドン、0.1% フィコール 400、0.01% 変性サケ精子DNAを含む6×SSC (1×SSCは0.15M NaCl、0.015M クエン酸ナトリウム、pH 7.0を示す) 中で、50℃で12～20時間、標識DNAプローブと共にインキュベートする。インキュベーション終了後、0.5% SDSを含む2×SSC中、37℃の条件での洗浄から始めて、SSC濃度は0.1×SSCまでの範囲で、また、温度は50℃までの範囲で変化させ、固定された標識DNAプローブ由来のシグナルがバックグラウンドと区別できるようになるまでメンブレンを洗浄する。

また、ハイブリダイゼーションにかえて本発明の遺伝子の塩基配列の一部をプライマーに用いる遺伝子増幅法、例えばPCR法を利用することができる。PCRの条件は、プライマーDNA又は鋳型DNAの配列等により、適宜設定すればよい。こうして得られた遺伝子が目的の機能を有するタンパク質をコードするものであるかどうかは、該遺伝子にコードされるタンパク質を適当な宿主と発現系とを利用して発現させ、得られるタンパク質の活性を確認することによって調べ

ることができる。

また、本発明においてアミノ酸配列あるいは塩基配列に1個以上の置換、欠失、付加又は挿入を有するアミノ酸配列あるいは塩基配列を人為的に作製する方法としては、例えば、1989年、コールド スプリング ハーバー ラボラトリー発行、T. マニアティス (T. Maniatis) ら編集、モレキュラー クローニング: ア ラボラトリー マニュアル第2版 (Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2nd ed.) 等に記載の種々の遺伝子工学的手法が挙げられ、具体例としては、部位特異的変異導入法、カセット変異法等の遺伝子工学的手法が挙げられる。前記部位特異的変異導入法によれば、1個若しくは数個の置換、欠失、付加、又は挿入を有するアミノ酸配列あるいは塩基配列を作製することができる。また、前記カセット変異法によれば、前記部位特異的変異導入法により得られた配列に比べて、より大きな領域の欠失、付加又は挿入を有するアミノ酸配列あるいは塩基配列を作製することができ、このような改変体も機能的に同等である限り、本発明の範囲内である。さらに、遺伝子工学的なタンパク質の生産において、目的のタンパク質をコードする本来の遺伝子上で使用されているコドンが宿主中では使用頻度の低いものであった場合には、タンパク質の発現量が低いことがある。このような場合には、コードされているアミノ酸配列に変化を与えることなく、コドンを宿主で繁用されているものに人為的に変換することにより、目的タンパク質の高発現を図ることが行われている (例えば、特公平7-102146号公報)。

(b) 本発明のDNAポリメラーゼ関連因子をコードする遺伝子のクローニング

得られたクローンの解析、発現産物であるDNAポリメラーゼ関連因子の理化学性質、機能の解明などについて、以下に詳細に説明する。

本発明のDNAポリメラーゼ関連因子は、前記のとおりDNAポリメラーゼの

有するDNA合成活性を促進する作用、又は該因子がDNAポリメラーゼに結合する性質を有している。したがって、これらの作用を指標として該因子を取得することができる。

本発明のDNAポリメラーゼ関連因子の取得に利用されるDNAポリメラーゼとしては、特に限定がないが、例えば、ピロコッカス フリオサスの生産するDNAポリメラーゼを挙げることができる。ピロコッカス フリオサスの生産するDNAポリメラーゼとしては、例えば、ピロコッカス フリオサス (*Pyrococcus furiosus*) DSM 3638 株由来の、配列表の配列番号：5 及び／又は配列番号：6 に示されるアミノ酸配列を有するDNAポリメラーゼ構成タンパク質を含有する酵素が使用できる。

なお、本明細書においては、同じくピロコッカス フリオサスより見い出されている α 型DNAポリメラーゼ [Pfu DNAポリメラーゼ、ヌクレイックアシッド リサーチ (Nucleic Acids Research)、第21巻、259-265頁 (1993)] と区別するため、この酵素をPfuポリメラーゼCと記載する。該酵素をコードする遺伝子は、プラスミドpFU1001に含有されており、また、該プラスミドで形質転換された大腸菌JM109の形質転換体は *Escherichia coli* JM109 /pFU1001 と命名、表示され、平成7年8月11日 (原寄託日) よりブタペスト条約のもと、日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号 (郵便番号305-8566) の通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号FERM BP-5579として寄託されている。したがって、PfuポリメラーゼCは、該形質転換体を培養し、得られた培養物より精製を行って得ることができる。なお、該PfuポリメラーゼCは、配列表の配列番号：5 及び配列番号：6 に示されるアミノ酸配列を有するDNAポリメラーゼ構成タンパク質を含有する酵素である。

PfuポリメラーゼCは、以下に示すような性質を有する酵素である。

(A) 一本鎖の鋳型DNAにプライマーがアニーリングした複合体を基質とし

てポリメラーゼ活性を測定した場合に、活性化DNAを基質とした場合に比べて高い活性を示す。

(B) 3' → 5' エキソヌクレアーゼ活性を有する。

(C) λ-DNAを鋳型としたポリメラーゼ チェーン リアクション (PCR) 反応を以下の条件で行った場合、他の酵素の添加なしに約20キロ塩基対のDNA断片を増幅することが可能である。

PCRの条件:

a) 反応液組成: 10 mM トリス-塩酸 (pH 9.2)、3.5 mM MgCl₂、75 mM KCl、それぞれ400 μMのdATP、dCTP、dGTP及びdTTP、0.01% ウシ血清アルブミン、0.1% トリトンX-100、5.0 ng/50 μl λ-DNA、10 pmole/50 μl プライマーλ1 (配列表の配列番号: 58)、及びプライマーλ11 (配列表の配列番号: 59)、3.7単位/50 μl DNAポリメラーゼを含む。

b) 反応条件: 98℃、10秒〜68℃、10分を1サイクルとした30サイクルのPCRを行う。

(D) SDS-PAGE上で、約90,000ダルトン、約140,000ダルトンに相当する2種のDNAポリメラーゼ構成タンパク質よりなる。

本発明のDNAポリメラーゼ関連因子を取得する方法は特に限定がないが、例えば、上記のPfuポリメラーゼC等のDNAポリメラーゼを適当な担体に固定化し、これとDNAポリメラーゼ関連因子を含有する試料とを混合し、担体に結合しなかったものを除去した後、結合したものを溶出させることで取得することができる。DNAポリメラーゼの担体への固定化は、公知の方法で行うことができる。また、DNAポリメラーゼに対する抗体を作製し、これを固定化した担体を利用してDNAポリメラーゼを固定化してもよい。例えば、抗PfuポリメラーゼC抗体を作製し、該抗体を用いて、ピロコッカス フリオサス由来の試料、例えば、ピロコッカス フリオサスの細胞破碎液から本発明のDNAポリメラー

ゼ関連因子を取得しようとする場合には、このような抗体固定化担体を使用すれば試料中のPfuポリメラーゼCがこの抗体に結合するため、試料と別に該PfuポリメラーゼCを添加する必要はなく、容易にDNAポリメラーゼ関連因子を精製することができる。

本発明のDNAポリメラーゼ関連因子の取得に使用する試料としては、特に限定がないが、例えば、微生物由来の試料を使用することができ、具体的には、ピロコッカス フリオサス DSM 3638 株由来の試料を使用することができる。該菌株は、ドイッチェ ザムルンク フォン ミクロオルガニズメン ウント ツェルクルチェウレン GmbH より入手可能である。該菌株を適当な増殖培地で培養し、培養物より調製した細胞破碎液を抗PfuポリメラーゼC抗体固定化担体を充填したカラムにアプライすると、PfuポリメラーゼC以外に数種のタンパク質がカラムに吸着される。これらのタンパク質をコードする遺伝子は、次に例示する工程によりクローニングすることができる。

まず、公知の方法を用いて、上記のタンパク質を単離してそのN末端アミノ酸配列を決定し、これを参考にプライマー又はプローブとして使用するための合成オリゴヌクレオチドを作製する。次に、この合成オリゴヌクレオチドをプライマーに用い、ピロコッカス フリオサスのゲノムDNAを鋳型としたPCRを行うことにより、目的の遺伝子を含むDNA断片を取得することができる。PCRの条件は、適宜設定すればよい。あるいは、上記オリゴヌクレオチドをプローブに用いたハイブリダイゼーションを行うことによって、ピロコッカス フリオサスのゲノムDNAより目的の遺伝子を含むDNA断片を取得することができる。この場合、ハイブリダイゼーションとしては、適当な制限酵素で消化したピロコッカス フリオサスのゲノムDNAを用いるサザンハイブリダイゼーション、該ピロコッカス フリオサスのゲノムDNAの遺伝子ライブラリーを用いたコロニーハイブリダイゼーション、ブランクハイブリダイゼーション、ドットハイブリダイゼーションなどが使用できる。

こうして得られたDNA断片は、目的の遺伝子全長を含んでいない場合には、得られたDNA断片の塩基配列を参考にして新たなプライマーを作製し、さらにPCRを行うか、又は得られたDNA断片若しくはその一部をプローブに用いたハイブリダイゼーションを行うことによって、目的の遺伝子全長を得ることができる。

上記のPCRやハイブリダイゼーション操作は、例えば、特に限定がないが、1989年、コールド スプリング ハーバー ラボラトリー発行、T. マニアティス (T. Maniatis) ら編集、モレキュラー クローニング：ア ラボラトリー マニュアル第2版 (Molecular Cloning : A Laboratory Manual 2nd ed.) を参考に実施することができる。

ピロコッカス フリオサス DSM 3638株の細胞破碎液を上記の抗PfuポリメラーゼC抗体固定化担体と混合した場合、該担体にはPfuポリメラーゼCの他に7種のタンパク質が吸着される。このうちの6種類については、本発明においてその遺伝子が上記の操作によって単離されている。これらのタンパク質は、それぞれF1、F2、F3、F4、F5及びF7と命名されており、本発明のDNAポリメラーゼ関連因子の具体例である。これらをコードする遺伝子のオープンリーディングフレームの塩基配列を、それぞれ配列表の配列番号：18、26、79、33、69及び2に示す。また、これらの塩基配列から推定される各タンパク質のアミノ酸配列を、それぞれ配列表の配列番号：19、27、80、34、70及び1に示す。

クローニングした遺伝子を適当な宿主、例えば大腸菌に導入することにより、そこにコードされるタンパク質を発現させることができる。例えば、上記のF7をコードする遺伝子を導入された大腸菌JM109の形質転換体は *Escherichia coli* JM109 / pF7-HH-18 と命名、表示され、平成9年6月3日（原寄託日）より、ブタペスト条約のもと、日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号（郵便番号305-8566）の通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号

FERM BP-6338として寄託されている。該形質転換体を培養し、培養物よりF7を取得することができる。こうして得られたF7は、該タンパク質の単離に用いられたPfuポリメラーゼCの他、ピロコッカス フリオサス由来の α 型ポリメラーゼ(Pfu DNAポリメラーゼ)及びピロディクティウム オカルタム(Pyrodicticum occultum)由来の2種のDNAポリメラーゼ[ジャーナル オブ バクテリオロジー(J. Bacteriol.)第177巻、第2164~2177頁(1995)]の活性を促進することが本発明において明らかにされている。

また、前記のF1、F2、F3、F4及びF5も、それぞれPfuポリメラーゼCやPfu DNAポリメラーゼの活性を促進することが明らかにされている。

上記のピロコッカス フリオサス DSM3638株由来のタンパク質のアミノ酸配列を既知のタンパク質のアミノ酸配列と比較した場合、F1はヘモフィルス インフルエンザ(Haemophilus influenzae)由来の一本鎖DNA特異的エキソヌクレアーゼ[サイエンス(Science)、第269巻、第496~512頁(1995)]との間にホモロジーを有している。F3は、マイコプラナ ラモサ(Mycoplasma ramosa)由来のアセチルポリアミンアミノヒドラーゼ[ジャーナル オブ バクテリオロジー(Journal of Bacteriology)、第178巻、第5781~5786頁(1996)]及びヒトのヒストンデアセチラーゼ[サイエンス(Science)、第272巻、第408~411頁(1996)]との間とホモロジーを有している。また、F7は真核生物のDNA複製に関与する増殖細胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen: PCNA)[エンボ ジャーナル(EMBO J.)、第11巻、第5111~5120頁(1995)];ヌクレイック アシッズ リサーチ(Nucleic Acids Research)、第18巻、第1363~1381頁(1990);プロシーディングス オブ ザ ナショナル アカデミー オブ サイエンス オブ ザ USA(Proc. Natl. Acad. Sci. USA)、第

84巻、第1575～1579頁(1987)]との間にホモロジーを有している。F2、F4及びF5については、既知のタンパク質とのホモロジーは見い出されていない。

PCNAは、複製因子C(RFC、RF-C)と複合体を形成して、DNA合成に関与すると報告されている[生化学、第68巻、第1542～1548頁(1996)]。したがって、ピロコッカス フリオサスにおいてもRFCに相当するタンパク質が発現され、上記のF7と共にDNA合成反応に関与していることが期待される。このタンパク質を取得し、例えば、上記のF7と共にDNAポリメラーゼの反応系に添加することにより、さらに優れたDNAポリメラーゼ活性促進効果を得ることができる。ピロコッカス フリオサスのRFCホモログをコードする遺伝子は、以下に示す工程によって取得することができる。

古細菌メタノコッカス ジャナシ(Methanococcus jannaschii)染色体DNAの全塩基配列はすでに解明されており[サイエンス(Science)、第273巻、第1058～1073頁(1996)]、該塩基配列にはPCNA及びRFCのホモログと考えられるタンパク質をコードする遺伝子が含まれている。該菌株のRFC 小サブユニット及び大サブユニットのホモログの遺伝子ならびに既知のRFC 小サブユニット遺伝子がコードしているアミノ酸配列[ヌクレイック アシズ リサーチ(Nucleic Acids Research)、第21巻、第1～3頁(1993);ヌクレイック アシズ リサーチ(Nucleic Acids Research)、第22巻、第1527～1535頁(1994)]を比較して、相同性の高いアミノ酸配列を調べ、これを参考にRFC 小サブユニット及び大サブユニットをコードする遺伝子断片を取得するためのプライマー又はプローブとして使用する合成オリゴヌクレオチドを作製することができる。続いて、該オリゴヌクレオチドを使用し、上記のF1～F7をコードする遺伝子の取得に用いられた操作によって、例えば、ピロコッカス フリオサス由来のRFC 小サブユニットのホモログであるPFU-RFCをコードする遺伝子及びRFC 大サブユニットの

ホモログであるPFU-RFCLSをコードする遺伝子を取得することができる。

こうして得られたPFU-RFCをコードする遺伝子の塩基配列を決定して、そこにコードされていると推定されるアミノ酸配列を調べ、これと既知のRFC小サブユニットのアミノ酸配列とを比較した結果、該アミノ酸配列中に介在配列(intein)が存在していることが明らかにされた。

該遺伝子より介在配列に対応する領域を除去することにより、PFU-RFCを発現可能な状態で含む遺伝子を取得することができる。該遺伝子中のPFU-RFCをコードする領域のオープンリーディングフレームの塩基配列及び該塩基配列より推定されるPFU-RFCのアミノ酸配列を、それぞれ配列表の配列番号：4及び3にそれぞれ示す。また、PFU-RFCLS遺伝子中のPFU-RFCLSをコードするオープンリーディングフレームの塩基配列及びそこにコードされるタンパク質のアミノ酸配列を、配列表の配列番号：63及び64にそれぞれ示す。これらの両タンパク質も本発明のDNAポリメラーゼ関連因子の具体例の1つである。

さらに、該遺伝子を用いて、PFU-RFCの発現に使用するためのプラスミドを構築することができる。このような発現プラスミドとしては、プラスミドpRFS254SNcがあり、また、該プラスミドを導入された大腸菌JM109の形質転換体は *Escherichia coli* JM109 /pRFS254SNcと命名、表示され、平成9年6月3日(原寄託日)より、ブタペスト条約のもと、日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号(郵便番号305-8566)の通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号：FERM BP-6339として寄託されている。該形質転換体を培養し、培養物よりPFU-RFCを取得することができる。該PFU-RFCは、単独でDNAポリメラーゼの活性を促進し、さらに上記のF7と併用した場合には、各タンパク質を単独で添加した場合に比べて相乗効果的な促進作用が認められる。

また、PFU-RFC遺伝子とPFU-RFCLS遺伝子の両方を導入された形質転換体を作製することにより、PFU-RFCとPFU-RFCLSにより形成された複合体（以下、holo-RFCという。また、特に遺伝子工学的に生産されたholo-RFCをrRFC-M複合体と記載する。）を発現させることができる。前記複合体は、DNAポリメラーゼ活性を促進し、特に前記F7と併用した場合に高い効果を示す。

前記PFU-RFC及びPFU-RFCLSは、F7と混合して用いることで、よりDNAポリメラーゼ活性を促進することができる。この場合、前記holo-RFC（又はrRFC-M複合体）とF7とを混合して用いてもよく、前記PFU-RFC、PFU-RFCLS及びF7からなる複合体（RFC-N複合体）として用いてもよい。

以上に説明したとおり、本発明によりDNAポリメラーゼの有するDNA合成活性を促進するDNAポリメラーゼ関連因子及び該因子をコードする遺伝子が提供される。該因子は、その遺伝子を利用することにより、遺伝子工学的に生産することが可能である。さらに、該遺伝子を利用して、本発明のDNAポリメラーゼ関連因子と同等の機能を有するタンパク質をコードする遺伝子を取得することもできる。

本発明のDNAポリメラーゼ関連因子には、前述のようにDNA合成反応に関与することが知られているタンパク質、例えば、真核生物由来のPCNA、RFCなどのタンパク質との間にホモロジーを有するものが含まれている。これらのPCNA、RFCなどのタンパク質は複合体を形成し、DNAポリメラーゼ δ によるDNA合成反応に関与するといわれている〔生化学、第68巻、第1542～1548頁（1996）〕。しかしながら、本発明に開示されたDNAポリメラーゼ関連因子は、複合体のみならず、それぞれ単独でもDNAポリメラーゼの活性を促進し、また、DNAポリメラーゼ δ とは構造的に異なるDNAポリメラーゼにも効果を示す。

促進することができるものであり、DNAポリメラーゼが利用されるさまざまな工程、例えば、DNA塩基配列の決定、DNAの標識、PCRによるDNAの増幅等に利用できる。DNAポリメラーゼの反応系に本発明のDNAポリメラーゼ関連因子を添加にすることによって、特にプライマーからDNA鎖を伸長する活性に改善が見られる。また、該因子は高い熱安定性を有していることから、PCR、特に長鎖のDNAの増幅が望まれるPCRに利用することができる。

さらに、本発明のDNAポリメラーゼ関連因子のうち、DNAポリメラーゼに結合する活性を有するものは、DNAポリメラーゼの検出、精製などに使用することができる。例えば、本発明のDNAポリメラーゼ関連因子を結合させた担体を使用したアフィニティークロマトグラフィーを行うことにより、該因子が結合するDNAポリメラーゼを効率よく精製することができる。

3. 本発明のDNAポリメラーゼ関連因子の製造方法

本発明のDNAポリメラーゼ関連因子の製造方法は、本発明の遺伝子を含有させた形質転換体を培養し、DNAポリメラーゼの有するDNA合成活性を促進する、又はDNAポリメラーゼに結合する活性を有する耐熱性のDNAポリメラーゼ関連因子を該培養物から採取する工程を含むことを1つの特徴とする。

本発明のDNAポリメラーゼ関連因子の製造方法においては、タンパク質の精製に一般的に用いられる方法を適用することができる。例えば、本発明のDNAポリメラーゼ関連因子をコードするDNAを発現ベクターに連結し、発現ベクターのプロモーターの制御下で過剰発現させることができる。また、本発明のDNAポリメラーゼ関連因子をコードするDNAと慣用のグルタチオンレダクターゼ、 β -ガラクトシダーゼ等のタンパク質をコードするDNA又はヒスチジンタグをコードするDNAとを連結させ、融合タンパク質として発現させることにより、本発明の遺伝子を保持する形質転換体からの該DNAポリメラーゼ関連因子の採取を容易にすることができる。前記融合タンパク質は、通常用いられるニッケ

ルカラム等のアフィニティーカラムクロマトグラフィー等を用いることにより容易に分離することができる。前記融合タンパク質は、常法によりグルタチオンレダクターゼ、 β -ガラクトシダーゼ等のタンパク質から、本発明のDNAポリメラーゼ関連因子を分離することができる。

また、発現させた本発明のDNAポリメラーゼ関連因子は、ピロコッカス フリオサスから本発明のDNAポリメラーゼ関連因子を取得する方法と同様に、PfuポリメラーゼC等のDNAポリメラーゼを適当な担体に固定化し、これとDNAポリメラーゼ関連因子を含有する試料とを混合し、担体に結合しなかったものを除去した後、結合したものを溶出させることによって得ることができる。

4. DNAの合成方法

本発明のDNAの合成方法は、前記本発明のDNAポリメラーゼ関連因子の存在下に、DNAポリメラーゼを用いてDNAを合成することを1つの大きな特徴とする。本発明のDNAの合成方法においては、本発明のDNAポリメラーゼ関連因子の存在下に、DNAポリメラーゼを用いてDNAを合成することにより、約20kbの長鎖のDNAを増幅することができる。

本発明のDNAの合成方法に用いられるDNAポリメラーゼ関連因子としては、F1、F2、F3、F4、F5、F7、PFU-RFC及びPFU-RFCLS等が挙げられる。本発明のDNAの合成方法においては、前記DNAポリメラーゼ関連因子は、単独で又は2種以上を混合して用いてもよい。本発明のDNAの合成方法においては、例えば、F7、PFU-RFC及びPFU-RFCLSの3種のDNAポリメラーゼ関連因子を用いることにより、従来のDNA合成方法で得られるDNA断片長に比べ、より長いDNA断片を合成することができる。本発明のDNAの合成方法においては、前記3種のDNAポリメラーゼ関連因子は、それぞれを単独で混合して用いてもよく、F7と、PFU-RFC及びPFU-RFCLSからなるholo-RFC(rRFC-M複合体)との2種を

混合してもちいてもよい。さらに、前記3種のDNAポリメラーゼ関連因子は、F7、PFU-RFC及びPFU-RFCLSからなる複合体(RFC-N複合体)を用いてもよい。

本発明のDNAの合成方法に用いられるDNAポリメラーゼとしては、イー・コリ(E. coli)由来のポリI等のDNAポリメラーゼ、サーマス サーマフィラス(Thermus thermophilus)由来のTth DNAポリメラーゼ、サーマス アクアティカス(Thermus aquaticus)由来のTaq DNAポリメラーゼ、ピロコッカス フリオサス由来のPfu DNAポリメラーゼ等に代表される耐熱性DNAポリメラーゼが挙げられる。

また、本発明のDNAの合成方法においては、前記DNAポリメラーゼを用い、PCR法によりDNAを合成することができる。

本発明のDNAの合成方法において、本発明のDNAポリメラーゼ関連因子を存在させるための使用量は、特に限定されず、DNAポリメラーゼの有する合成活性を促進する活性を発揮させるのに十分な量を使用すればよい。

5. 本発明のDNAポリメラーゼ関連因子を含有するキット

本発明のDNAポリメラーゼ関連因子は、DNAポリメラーゼが使用される種々の反応に利用することができる。したがって、試験管内でのDNA合成反応を行うためのキット、例えば、ジデオキシ法によるDNA塩基配列決定のためのキット、DNA標識用キット、PCRキット等に本発明のDNAポリメラーゼ関連因子を添付することにより、これらのキットの性能を改善することができる。このようなキットとしては、DNAポリメラーゼと本発明のDNAポリメラーゼ関連因子を含むものの他、例えば、dNTP、MgCl₂などのDNAポリメラーゼの反応に必要な試薬を含んでもよい。本発明のキットに含有されるDNAポリメラーゼ関連因子としては、F1、F2、F3、F4、F5、F7、PFU-RFC及びPFU-RFCLS等が挙げられる。本発明のキットにおいては、

前記DNAポリメラーゼ関連因子は、単独で又は2種以上を混合して用いてもよい。F7、PFU-RFC及びPFU-RFCLSの3種のDNAポリメラーゼ関連因子を用いることが好ましい。前記3種のDNAポリメラーゼ関連因子は、それぞれを単独で混合して用いてもよく、F7と、PFU-RFC及びPFU-RFCLSからなるholo-RFC (rRFC-M複合体) との2種を混合してもちいてもよい。さらに、前記3種のDNAポリメラーゼ関連因子は、F7、PFU-RFC及びPFU-RFCLSからなる複合体 (RFC-N複合体) を用いてもよい。また、本発明のキットに含有されるDNAポリメラーゼとしては、イー・コリ (E. coli) 由来のPol I 等のDNAポリメラーゼ、サーモフィラス (Thermus thermophilus) 由来のTth DNAポリメラーゼ、サーモアクアティカス (Thermus aquaticus) 由来のTaq DNAポリメラーゼ、ピロコッカス フリオサス由来のPfu DNAポリメラーゼ等に代表される耐熱性DNAポリメラーゼが挙げられる。本発明のキットにおいては、耐熱性DNAポリメラーゼを含有させることが好ましい。本発明のキットを前記DNAの合成方法に用いることにより、より簡便に高分子のDNAを合成することができる。

実施例

以下、実施例により本発明をさらに詳しく説明するが、本発明はこれらの実施例によりなんら限定されるものではない。

実施例1

(1) ピロコッカス フリオサスのゲノムDNAの調製

ピロコッカス フリオサスDSM3638の培養は以下のとおりに行った。

トリプトン1%、酵母エキス0.5%、可溶性デンプン1%、ジャマリンS・ソリッド (ジャマリンラボラトリー社製) 3.5%、ジャマリンS・リキッド (ジャマリンラボラトリー社製) 0.5%、MgSO₄ 0.003%、NaCl 0.001%、FeSO₄ · 7H₂O 0.0001%、CoSO₄ 0.0

0.01%、 $\text{CaCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.0001%、 ZnSO_4 0.0001%、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.1ppm、 $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2$ 0.1ppm、 H_3BO_3 0.1ppm、 $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.1ppm、 $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.25ppmの組成の培地を2リットル容のメディウムボトルに入れ、120℃、20分間殺菌した後、窒素ガスを吹込み、溶存酸素を除去した後、得られた培地に前記菌株を接種して、95℃、16時間静置培養した。培養終了後、遠心分離によって菌体を集めた。

つぎに、菌体を25%スクロースを含む0.05Mトリス-塩酸(pH8.0) 4mlに懸濁し、この懸濁液に0.8mlのリゾチーム[5mg/ml、0.25Mトリス-塩酸(pH8.0)]、2mlの0.2M EDTAを加えて、20℃で1時間保温した後、24mlのSET溶液[150mM NaCl、1mM EDTA、20mMトリス-塩酸(pH8.0)]を加え、さらに、5% SDS 4ml、プロティナーゼK(10mg/ml) 400 μ lを加え、37℃、1時間反応させた。反応終了後、フェノール-クロロホルム抽出、続いてエタノール沈殿を行い、約3.2mgのゲノムDNAを調製した。

(2) コスミドDNAライブラリーの作製

ピロコッカス フリオサスDSM3638のゲノムDNA 400 μ gをSau3AIで部分消化し、密度勾配超遠心法により35~50kbにサイズ分画した。つぎに、トリプルヘリックスコスミドベクター(ストラタジーン社製) 1 μ gをXbaI消化した後、アルカリフォスファターゼ(宝酒造社製)を用いて脱リン酸化し、さらにBamHI消化した後、上記の分画された35~50kbのDNA 140 μ gと混合した後、ライゲーション反応を行った。得られた反応液とガイガーバック・ゴールド(ストラタジーン社製)とを用いたイン・ビトロ・パッケージング法によって、ピロコッカス フリオサスのゲノムDNAのフラグメントを有するコスミドをラムダファージ粒子中にパッケージングし、コスミドライ

ブラリーを調製した。次に、このライブラリーの一部を用いて大腸菌DH5 α MC R (BRL社製) に形質導入した。得られた形質転換体より500個クローンを選んで、それぞれコスミドクローンNo. 1~No. 500とし、さらに、それぞれのクローンからコスミドDNAを調製した。これらのうち数個を選んで制限酵素消化を行い、適当な大きさの断片が挿入されていることを確認した。

(3) PfuポリメラーゼC遺伝子のクローニング

反応溶液として、20mMトリス-塩酸 (pH7.7)、2mM MgCl_2 、2mM 2-メルカプトエタノール、0.2mg/ml 活性化DNA、それぞれ、40 μM のdATP、dCTP、dGTP及びdTTP、60nM [^3H]-dTTP (アマシャム社製) を用意した。上記のコスミドDNAライブラリーの各クローン由来の抽出液1 μl を5クローン分 (5 μl) を前記反応溶液45 μl に添加し、75 $^{\circ}\text{C}$ で15分反応させた後、得られた各反応物からそれぞれ40 μl 分をDEペーパーにスポットし、5% Na_2HPO_4 で洗浄を5回を行い、DEペーパー上に残っている放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定した。5クローンを1グループとして一次測定を行なった。活性が認められたグループは、続いて5クローンを1クローンずつに分け、二次測定を行った。コスミドDNAライブラリー中に既知のDNAポリメラーゼ遺伝子を含むものは、予め該遺伝子をプローブとしたハイブリダイゼーションテストより、クローンNo. 57、154、162及び363であることが分かっていることから、これら以外のクローンでDNA合成活性を含むクローンとして、No. 41、153、264、462及び491の5クローンを得た。

前記5クローンについて、コスミドを単離し、それぞれをBamHIで分解してその泳動パターンを調べてみると互いに共通するバンドが何本か見られ、この5クローンはオーバーラップしながら、少しずつずれた領域を組込んでいることが予想された。そこで、クローンNo. 264及び491の挿入DNA断片につ

いて、制限酵素地図を作製した。得られた制限酵素地図をもとに、クローン264又は491由来のコスミドより10キロ塩基対前後の種々のDNA断片を切り出し、pTV118N又はpTV119Nベクター（宝酒造社製）にサブクロニングした。得られた組換えプラスミドを保持する形質転換体について、耐熱性DNAポリメラーゼ活性を測定した結果、約10キロ塩基対のXbaI-XbaI断片に強い耐熱性DNAポリメラーゼを産生する遺伝子があることが判明した。そこで、該XbaI-XbaI断片がpTV118Nベクターに組み込まれたものをプラスミドpFU1001と命名し、該プラスミドで形質転換された大腸菌JM109を *Escherichia coli* JM109 /pFU1001 (FERM BP-5579) と命名した。

(4) PfuポリメラーゼCのDNAポリメラーゼ構成タンパク質の解析

上記のプラスミドpFU1001よりDNAポリメラーゼ遺伝子を含む上記XbaI-XbaI断片をもう一度XbaIで切り出し、DNAブランディングキット（宝酒造社製）を用いて平滑末端化した後、新たなpTV118NベクターをSmaIで開環したものと連結して欠損変異体作製用プラスミドを調製し、挿入断片の方向性によってそれぞれpFU1002及びpFU1003と命名した。これらのプラスミドを用いて、挿入DNA断片の両端から順次欠失させることにより欠損変異体を作製した。作製には、Henikoffの方法（ジーン（Gene）第28巻、第351-359頁）を応用した Kilo-Sequence用 Deletion kit（宝酒造社製）を利用した。3' 突出型及び5' 突出型制限酵素としては、それぞれPstI及びXbaIを利用した。得られた種々の欠損変異体を鋳型として、BcaBEST ジデオキシシーケンスキット（宝酒造社製）を用いたジデオキシ法により挿入断片の塩基配列を決定した。得られた塩基配列を解析した結果、タンパク質をコードしうる6つのオープンリーディングフレーム（ORF）が見い出された。種々の欠損変異体を用いて、耐熱性DNAポリメラーゼ活性を測定したとこ

ろ、ORF 3 及び ORF 4 の翻訳産物が DNA ポリメラーゼ活性の発現に重要であることが示された。配列表の配列番号：5 に ORF 3 のアミノ酸配列、配列番号：6 にアミノ酸配列をそれぞれ示す。即ち、P f u ポリメラーゼ C は、それぞれ配列表の配列番号：5 及び配列番号：6 に示されるアミノ酸配列を有する 2 種の DNA ポリメラーゼ構成タンパク質を含有する酵素である。

実施例 2

(1) P f u ポリメラーゼ C の調製

抗原とする P f u ポリメラーゼ C は以下のように調製した。Escherichia coli JM109 / pFU1001 を 100 μ g / ml のアンピシリンを含む LB 培地（トリプトン 1.0 %、酵母エキス 0.5 %、塩化ナトリウム 0.5 %、pH 7.2）2 リットル中で培養した。培養液の濁度が 0.6 A₆₀₀ に達した時、誘導物質であるイソプロピル- β -D-チオガラクトシド（IPTG）を最終濃度 1 mM となるように添加し、さらに 16 時間培養を行った。集菌後、菌体を 37 ml のソニケーションバッファー（50 mM トリス-塩酸 pH 8.0、2 mM 2-メルカプトエタノール、10 % グリセロール、2 mM PMSF（フェニルメタンスルフォニルフルオリド））に懸濁し、超音波破碎機にかけた。この破碎液を 12000 rpm、10 分遠心分離して得られた上清を 80 °C、15 分間の熱処理にかけた。その後、再度 12000 rpm、10 分の遠心分離を行って上清を集め、33 ml の熱処理上清液を得た。次に、この溶液を、バッファー A（50 mM リン酸カリウム、pH 6.5、2 mM 2-メルカプトエタノール、10 % グリセロール）2 リットルを透析外液として、2 時間の透析を 4 回行った。透析後の酵素液 32 ml をバッファー A で平衡化した RESOURCE Q カラム（ファルマシア社製）に供し、FPLC システム（ファルマシア社製）を用いてクロマトグラフィーを行った。溶出は、0 ~ 500 mM の NaCl 直線濃度勾配により行った。DNA ポリメラーゼ活性は、340 mM NaCl の濃度で

溶出された。

活性のある画分を集めて得られた10mlの酵素溶液を、セントリフロー CF-50（グレースジャパン社製）を用いて濃縮した後、PD-10カラム（ファルマシア社製）で150mM NaClを含むバッファーAに置換し、得られた3.5mlの酵素溶液を、同じバッファーで平衡化したHiTrap Heparin カラム（ファルマシア社製）に供した。FPLCシステムを用いて150～650mM NaCl直線濃度勾配により溶出し、400mM NaClの濃度で溶出された活性画分を得た。この画分5mlを、セントリコン-10（アミコン社製）を用いた限外濾過により濃縮し、120 μ lの濃縮液を75mM 塩化ナトリウム、2mM 2-メルカプトエタノールを含む50mMリン酸カリウムバッファー（pH6.5）で平衡化したSuperose 6ゲル濾過カラム（ファルマシア社製）に供し、同じバッファーで溶出を行った結果、DNAポリメラーゼ活性は、保持時間34.7分及び38.3分の位置に溶出された。38.3分の位置に溶出された画分を濃縮し、得られた濃縮液を抗原として抗PfuポリメラーゼCポリクローナル抗体の調製に用いた。

なお、上記のPfuポリメラーゼCの精製において、酵素活性は以下の方法で測定した。基質には仔牛胸腺DNA（ワージントン社製）を活性化したもの（活性化DNA）を用いた。DNAの活性化及びDNAポリメラーゼ活性の測定は、ハーパー アンド ロー社発行、D. R. デービス（D. R. Davis）編集のDNAポリメラーゼ フロム エシェリヒア コリ（DNA polymerase from *Escherichia coli*）第263-276頁（C. C. リチャードソン著）に記載の方法で行った。活性を測定しようとする試料5 μ lに反応液[20mM トリス塩酸（pH7.7）、15mM MgCl₂、2mM 2-メルカプトエタノール、0.2mg/ml 活性化DNA、それぞれ40 μ MのdATP、dCTP、dGTP及びdTTP、60nM [³H]-dTTP（アマシャム社製）]45 μ lを添加し、75℃で5分間反応させた。そのうちの40 μ lをDEペーパー

(ワットマン社製)にスポットし、5% Na_2HPO_4 で洗浄を5回行った後、DEペーパー上に残存する放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定した。上記の酵素活性測定方法によって、30分間あたり10 nmolの $[\text{}^3\text{H}]$ -dTMPを基質DNAに取り込む酵素量を酵素1単位とした。

(2) 抗PfuポリメラーゼC抗体の調製

上記のPfuポリメラーゼC標品を1mg/100 μl となるよう50mM リン酸カリウム、pH 6.5、2mM 2-メルカプトエタノール、75mM NaCl で希釈し、これに等量の完全フロイント・アジュバントを加えて乳化させた。これを1回につき50 μl ずつ、3週間おきに4回ウサギ皮下に注射した。最終免疫より10日後に全血を採取し、これを室温に60分間放置した後、遠心分離して抗PfuポリメラーゼCポリクローナル抗体を含む抗血清60mlを得た。この抗血清20mlに20mlの飽和硫酸アンモニウム溶液を添加し、4°Cで45分間、ゆるやかに攪拌後遠心分離した。得られた沈殿を5mlの20mM リン酸ナトリウムバッファー pH 7.0に懸濁し、同じバッファー2リットルを透析外液として、2時間の透析を3回行った。透析後の溶液14mlを20mM リン酸ナトリウムバッファー (pH 7.0)で平衡化したプロテインAカラム(ファルマシア社製)に供し、同バッファーで洗浄後、0.1M クエン酸ナトリウムバッファー (pH 3.0)で溶出した。溶出した抗PfuポリメラーゼCポリクローナル抗体を、1M トリス塩酸、pH 9.0で中和後、セントリフローCF-50で濃縮し、PD-10カラム(ファルマシア社製)でカップリングバッファー(0.5M 塩化ナトリウム、0.2M 重炭酸ナトリウム、pH 8.3)に置換して抗PfuポリメラーゼC抗体を含む溶液を調製した。

(3) 抗PfuポリメラーゼC抗体カラムの作製

HiTrap NHS-activatedカラム(ファルマシア社製)を1

mM 塩酸 6mlで洗浄後、上記の抗PfuポリメラーゼCポリクローナル抗体溶液0.9ml (3.6mg相当の抗PfuポリメラーゼC抗体を含む)をアプライした。室温で1時間放置後、3mlのカップリングバッファーで洗浄した。続いてカラムを6mlのプロッキングバッファー (0.5M トリス-塩酸 pH 8.3、0.5M 塩化ナトリウム)、6mlのバッファーB (0.1M 酢酸ナトリウム pH 4.0、0.5M 塩化ナトリウム)、6mlのプロッキングバッファーで順次洗浄し、室温で30分間放置した。さらに、6mlのバッファーB、6mlのプロッキングバッファー、6mlのバッファーBでカラムを洗浄した後、50mM トリス-塩酸 pH 8.0でカラムを平衡化して抗PfuポリメラーゼC抗体カラムを作製した。

実施例3

(1) 抗PfuポリメラーゼC抗体カラムを用いたPfuポリメラーゼCを含む複合体の精製

ピロコッカス・フリオサスDSM3638を、実施例1記載の方法と同様に2本のメディウムボトルで16時間培養した。集菌後、菌体を34.7mlの2mM PMSFを含むバッファーC (50mM トリス-塩酸、pH 8.0、1mM ATP)に懸濁し、超音波破碎機にかけた。破碎液を12000rpm、10分間遠心して、得られた上清46mlをバッファーCで平衡化した抗PfuポリメラーゼC抗体カラムに供した。カラムをバッファーCで洗浄した後、溶出バッファー (0.1M グリシン-塩酸 pH 2.5、1mM ATP)でPfuポリメラーゼCを含む複合体を溶出した。溶出液を1M トリス-塩酸 pH 9.0で中和後、セントリフロー CF-50を用いて濃縮し、PfuポリメラーゼC複合体濃縮液とした。

(2) PfuポリメラーゼC複合体の解析

PfuポリメラーゼC複合体濃縮液を、SDS-PAGE (12.5% ポリアクリルアミドゲル、泳動緩衝液として25mM トリス-塩酸、192mM グリシン、0.1% SDS、pH 8.4を使用) に供し、得られたゲルについて、以下に示す方法により抗PfuポリメラーゼC抗体を用いたウエスタンブロッティングを行った。SDS-PAGE後のゲルを、40mM ϵ -アミノ-n-カプロン酸を含むブロッティング緩衝液1 (25mM トリス-塩酸、20% メタノール、pH 9.4) に浸した。次に、セミドライブロッティング装置 (サイエンティフィック社製) にブロッティング緩衝液2 (0.3M トリス-塩酸、20% メタノール、pH 10.4) に浸したろ紙、25mM トリス-塩酸、20% メタノール、pH 10.4に浸したろ紙、40mM ϵ -アミノ-n-カプロン酸を含むブロッティング緩衝液1に浸したPVDF膜、上記のゲル、及び40mM ϵ -アミノ-n-カプロン酸を含むブロッティング緩衝液1に浸したろ紙を重ねあわせ、2mA/cm²、1時間ブロッティングした。このPVDF膜を、0.01% チメロサルを含むブロックエース (雪印乳業株式会社製) に浸し、10分間振とうした後、0.01% チメロサルを含むブロックエースで1000倍希釈した抗PfuポリメラーゼC抗血清に膜を浸した。室温で1時間放置後、0.02% ツィーン-20を含むTBSバッファー (50mM トリス-塩酸、pH 7.5、150mM NaCl) で、10分間3回洗浄し、さらに、TBSバッファーで洗浄した。そして、0.01% チメロサルを含むブロックエースで5000倍希釈したペルオキシダーゼ標識抗ウサギIgG (Fc) 抗体 (オルガノンテクニカ社製) に膜を浸した。室温で1時間放置した後、PVDF膜を、0.02% ツィーン-20を含むTBSバッファーで10分間3回洗浄し、さらに、TBSバッファーで洗浄し、コニカイムノステインHRP-1000 (コニカ社製) に膜を浸し発色させた。図1に示すSDS-PAGE後のゲルをクマシーブリリアントブルーR-250で染色した結果と前記のウエスタンブロッティングとの結果から、上記複合体画分には、抗PFUポリ

メラゼC抗体と反応しない7種のタンパク質（図1に示すF1～F7）が含まれていることが明らかとなった。

抗PfuポリメラゼC抗体と反応しなかったバンドは、PfuポリメラゼCを介してカラムに吸着したタンパク質であると考えられるため、以下の方法でこれらのタンパク質のN末端アミノ酸配列を分析した。実施例3（1）で得られたPfuポリメラゼC複合体濃縮液を、上記と同様にSDS-PAGEし、PVDF膜上にブロッティングした。この膜をクマシーブリリアントブルーR-250で染色した後、目的のバンドを切り取り、この膜の断片を試料として、G1000Aプロテインシーケンサー（ヒューレット パッカード社製）を用いた自動エドマン分解法により、目的のタンパク質のN末端アミノ酸配列を決定した。その結果を表1に示す。また、得られたF1～F5及びF7のN末端アミノ酸配列を、それぞれ配列表の配列番号：7～12に示す。

表1

試料	N末端アミノ酸配列
F1	MDKEGFLNKVREAVDVVKLH
F2	MFTGKVLIPVKVLKKFENWN
F3	MIGSIFYSKKFNLHRPSEYH
F4	MKDYRPLLGAIKVKGDNVFS
F5	MDIEVLRRLLERELSEH
F6	解析できず
F7	PFEIVFEGAKEFAQLID

実施例4

カセットDNAの調製

実施例1で調製したピロコッカス・フリオサスのゲノムDNA 10 μ g を、E c o R I (宝酒造社製)で完全消化し、そのうち500 ng相当を50 ngのE c o R Iカセット(宝酒造社製)と混合した後、ライゲーションを行った。ライゲーション反応液よりエタノール沈殿を行って回収したDNAを、20 μ l の滅菌水に溶解し、これをE c o R IカセットDNAとして以降の操作に使用した。

前記と同様の操作で、H i n d I I I カセット、X b a Iカセット、S a l Iカセット、P s t Iカセット及びS a u 3 A Iカセット(全て宝酒造社製)がそれぞれ付加されたカセットDNAを調製した。なお、X b a Iカセットを付加する際には、X b a I及びN h e Iの2通りの酵素で消化されたゲノムDNAを使用し、得られたDNAをそれぞれX b a IカセットDNA及びN h e I/X b a IカセットDNAと命名した。また、S a l Iカセットを付加する際には、S a l I及びX h o Iの2通りの酵素で消化されたゲノムDNAを使用し、得られたDNAを、それぞれS a l Iカセット及びX h o I/S a l IカセットDNAと命名した。また、S a u 3 A Iカセットの付加にはB g 1 I I I消化されたゲノムDNAを使用し、得られたDNAをB g 1 I I I/S a u 3 A IカセットDNAと命名した。

実施例5

(1) F1遺伝子を含むコスミドクローンの選択

実施例3で得られたF1のN末端アミノ酸配列をもとに、配列表の配列番号：13及び14にそれぞれ塩基配列を示すプライマーF1-1及びF1-2を合成した。実施例4で調製したE c o R IカセットDNA 1 μ l を鋳型として、100 pmolずつのF1-1及びカセットプライマーC1(宝酒造社製)を用いて1回目のPCRを行い、その反応液1 μ l を鋳型として、100 pmolずつのF1-2及びカセットプライマーC2(宝酒造社製)を用いて2回目のPCRを行った。

この2回のPCRには、Pfu DNAポリメラーゼ（ α 型酵素、ストラタジーン社製）を用いた。反応液の組成及び反応の条件を以下に示す：20mM トリスー塩酸、pH 8.2、10mM KCl、20mM MgCl₂、6mM (NH₄)₂SO₄、0.2mM dATP、dCTP、dGTP、dTTP、1% トリトンX-100、0.01% BSA、及び2.5単位のPfu DNAポリメラーゼ（最終容量は100 μ l）、94℃（30秒）～45℃（30秒）～72℃（2分）を1サイクルとし、1回目のPCRは30サイクル、2回目は25サイクル行った。なお、以降の実施例に示すPfu DNAポリメラーゼを用いたPCRも、同じ組成の反応液を使用して行った。増幅した約550bpのDNA断片をプラスミドベクターpUC119（宝酒造社製）にサブクローニングし、その塩基配列を決定した。その後、得られた配列をもとに、配列表の配列番号：15及び16にそれぞれ塩基配列を示すプライマーF1S1及びF1S2を合成した。このF1S1及びF1S2を用いて、実施例1に示したコスミドDNAを鋳型にPCRを行い、F1遺伝子を含むコスミドクローンを選択した。PCRは、TaKaRa PCRアンプリフィケーションキット（宝酒造社製）を用い、添付の説明書に従って行った。この結果、No. 22、46、61、133、178、180、210及び317のコスミドクローンにF1遺伝子が含まれることがわかった。

（2）F1遺伝子のサブクローニング

実施例4で調製したHindIII カセットDNA 1 μ lを鋳型とし、各20pmolずつのF1S1及びカセットプライマーC2、又はF1S2及びカセットプライマーC2を用いてPCRを行った。PCRは、酵素にPfu DNAポリメラーゼを用い、実施例5（1）と同じ組成の反応液で、94℃（30秒）～55℃（30秒）～72℃（3分）を1サイクルとして50サイクルの反応を行った。その結果、F1S2及びカセットプライマーC2で570bpのDNA断片が増幅

したが、F1S1及びカセットプライマーC2ではDNAの増幅は見られなかった。これにより、HindIII サイトは、F1遺伝子の開始コドンのすぐ上流と、F1S1のアニーリングする位置からPfu DNAポリメラーゼで増幅できない距離にあることが予想された。そこで、同遺伝子を含むコスミドクローンから任意に選り出したNo. 61をHindIII で消化し、1.5 kb以上のDNA断片を単離して、プラスミドベクターpTV118N（宝酒造社製）にサブクローニングした。得られたそれぞれの組換えプラスミドを鋳型に、F1S1とF1S2をプライマーに用いてPCRによりF1遺伝子の有無を調べたところ、約2 kbのHindIII 断片にF1遺伝子が含まれることが判明した。このDNA断片中のF1遺伝子がpTV118Nベクターのlacプロモーター下流につながったプラスミドを、pF1-4-10と命名した。また、このプラスミドに含まれる挿入DNA断片について、NcoI、EcoRI、BamHI、PstI、SacI及びNdeIの制限酵素地図を作成したところ、図2に示すような結果が得られた。

(3) F1遺伝子を含むDNA断片の塩基配列の決定

プラスミドpF1-4-10及び該プラスミドより切りだしたNcoI-HindIII、EcoRI-EcoRI、BamHI-PstI、EcoRI-HindIII、HindIII-EcoRI及びHindIII-BamHI断片をそれぞれプラスミドベクターpTV119N（宝酒造社製）にサブクローニングし、得られた各プラスミドの挿入DNA断片の塩基配列をジデオキシ法により決定した。これらの結果を総合して得られた、pF1-4-10への挿入DNA断片の塩基配列のうちの2009 bpの配列を配列表の配列番号：17に示す。該塩基配列を解析した結果、F1のN末端アミノ酸配列を含むオープンリーディングフレームが見い出された。該配列を配列表の配列番号：18に、また該配列から推定されるF1の翻訳産物のアミノ酸配列を配列表の配列番号：19にそれぞれ示す

。このアミノ酸配列について既知のタンパク質のアミノ酸配列とのホモロジーを検索したところ、ヘモフィルス インフルエンザ由来の一本鎖DNA特異的エキソヌクレアーゼ [サイエンス (Science)、第269巻、第496～512頁 (1995)] との間に相同性が見られた。相同性は前半部分で23.2%、後半部分で24.3%あった。

(4) F1を発現するためのプラスミドの構築

実施例5(2)に記載のプラスミドpF1-4-10を鋳型とし、配列表の配列番号:20にその塩基配列を示すプライマーF1Nc及び上記のプライマーF1S2を用いて、PCRを行った。このPCRには、Pfu DNAポリメラーゼを使用し、実施例5(1)と同じ組成の反応液で行った。1ngの鋳型DNA及び20pmolずつの両プライマーを使用して、94℃(30秒)～55℃(30秒)～72℃(2分)を1サイクルとした25サイクルの反応を行った。増幅された約460塩基対のDNA断片を、NcoI及びBglII(ともに宝酒造社製)で消化して得られる断片と、上記のプラスミドpF1-4-10をBglIIとHindIIIで消化して得られるDNA断片とを合わせてプラスミドベクターpTV118N(宝酒造社製)のNcoI-HindIII サイト間に組み込んだ。このプラスミドをpF1Nc-2と命名した。該プラスミド中の挿入DNA断片のうち、PCRで増幅した領域は、ジデオキシ法で塩基配列を確認し、PCRに起因する変異のないことを確認した。

(5) 精製F1標品の調製

実施例5(4)で得られたプラスミドpF1Nc-2で形質転換された大腸菌JM109、Escherichia coli JM109 / pFINc2 を100μg/mlのアンプシリンを含む2リットルのLB培地で16時間培養を行った。集菌後、実施例2(1)と同じ方法で熱処理上清液を33ml得た。次に、この溶液をバッファーD

(50 mM トリシュー塩酸、pH 8.0、2 mM 2-メルカプトエタノール、10% グリセロール)で平衡化したRESOURCE Qカラム(ファルマシア社製)に供し、FPLCシステム(ファルマシア社製)を用いてクロマトグラフィーを行った。溶出は、0~500 mMのNaCl直線濃度勾配により行った。F1は340 mM NaClのところで溶出された。

F1画分を集めて得られた10 mlの酵素溶液を、セントリフロー CF50を用いて濃縮した後、PD-10カラム(ファルマシア社製)でバッファーDに置換し、3.5 mlの溶液を同じバッファーで平衡化したHiTrap Blueカラム(ファルマシア社製)に供した。FPLCシステムを用いてバッファーDでカラムを洗浄した後、2 M 塩化ナトリウムを含むバッファーDでF1を溶出した。この画分5 mlを、セントリコン-10を用いて濃縮し、120 μ lの濃縮液を2 mM 2-メルカプトエタノール、75 mM 塩化ナトリウムを含む50 mM トリシュー塩酸、pH 8.0で平衡化したSuperdex 200ゲル濾過カラム(ファルマシア社製)に供した。同じバッファーで溶出を行った結果、F1は、約49 キロダルトンの分子量に相当する位置に溶出された。この分子量は、F1が1量体として存在している場合に相当する。

(6) エキソヌクレアーゼ活性の測定

F1精製標品の5' \rightarrow 3' 及び3' \rightarrow 5' エキソヌクレアーゼ活性を以下のようにして調べた。

まずプラスミドベクターpUC119(宝酒造社製)を、SspI(宝酒造社製)で消化してアガロースゲル電気泳動に供し、386 bpのDNA断片をゲルから回収し、精製した。このDNA断片の5'-末端を、(γ - 32 P)-ATP(アマシャム社製)とポリヌクレオチドキナーゼ(宝酒造社製)を用いて標識し、得られた 32 P-標識DNA断片を5' \rightarrow 3' エキソヌクレアーゼ活性検出用基質として使用した。また、プラスミドベクターpUC119を、Sau3AI(

宝酒造社製)で消化し、得られた341bpのDNA断片を上記同様に回収、精製した。さらに、 $[\alpha-^{32}\text{P}]-\text{dCTP}$ (アマシャム社製)とクレノウフラグメント (宝酒造社製)を用いた末端修復反応により、このDNA断片の3'-末端を ^{32}P 標識し、3'→5'エキソヌクレアーゼ活性検出用基質を調製した。上記の2種の標識DNAはNICKカラム (ファルマシア社製)でゲル濾過して精製し、以下の反応に用いた。

これらの標識DNA断片2ng及び λ -DNA (宝酒造社製)をHaeIII (宝酒造社製)で完全消化し、得られた消化物12.5 μg 及び上記のF1精製標品を含む10 μl の反応液 (20mMトリス-塩酸、pH7.7、15mM MgCl₂、2mM 2-メルカプトエタノール)を調製し、85℃で2.5、5又は7.5分間反応させた後、エタノール沈殿を行ってDNAを沈殿させた。この上清中に存在する放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定することによって、エキソヌクレアーゼ活性による基質の分解量を求めた。なお、5'→3'エキソヌクレアーゼ活性測定には50fmol、3'→5'エキソヌクレアーゼ活性測定には125pmolのF1精製標品を加えた。これらの結果を図3及び図4にそれぞれ示す。

図3は、5'→3'エキソヌクレアーゼ活性の結果を、図4は3'→5'エキソヌクレアーゼ活性測定の結果をそれぞれ示している。図中横軸は反応時間を、縦軸は反応液全体に含まれる放射活性に対する上清に遊離した放射活性の割合を示す。また、図中、黒丸は本発明のF1精製標品について、白丸はF1精製標品を加えずに反応させたブランクについて得られた結果を示す。図に示されるように、本発明のF1精製標品は、5'→3'及び3'→5'エキソヌクレアーゼ活性の両方を有している。また、上記の結果より、5'→3'エキソヌクレアーゼ活性は、3'→5'エキソヌクレアーゼ活性に比べて約500倍強力であることが示された。

実施例 6

(1) F 2 遺伝子を含むコスミドクロンの選択

実施例 3 で得られた F 2 の N 末端アミノ酸配列をもとに、配列表の配列番号：21 及び 22 にその塩基配列を示すプライマー F 2 - 2 及び F 2 - 3 を合成した。実施例 4 で調製した X b a I カセット DNA 1 μ l を鋳型として、100 pmol のプライマー F 2 - 2 及び 20 pmol のカセットプライマー C 1 を用いて 1 回目の P C R を行い、さらに、その反応液 1 μ l を鋳型として、100 pmol のプライマー F 2 - 3 及び 20 pmol のカセットプライマー C 2 を用いて 2 回目の P C R を行った。この 2 回の P C R には、P f u ポリメラーゼ C を使用した。反応液の組成及び反応条件を以下に示す：10 mM トリスー塩酸、pH 9. 2、75 mM K C l、3. 5 mM M g C l₂、それぞれ 0. 4 mM d A T P、d C T P、d G T P 及び d T T P、0. 1% トリトン X - 100、0. 01% B S A、及び 2. 0 単位の P f u ポリメラーゼ C（最終容量は 100 μ l）、94°C（30 秒）～45°C（30 秒）～72°C（2 分）を 1 サイクルとして 1 回目は 30 サイクル、また 2 回目は 25 サイクルの反応を行った。増幅した約 250 b p の D N A 断片をプラスミドベクター p U C 119 にサブクローニングし、その D N A 配列を決定した後、得られた配列をもとに配列表の配列番号：23 及び 24 にその塩基配列を示すプライマー F 2 S 3 及び F 2 S 4 を合成した。このプライマーを用いて、実施例 1 で調製したコスミド DNA を鋳型に P C R を行い、F 2 遺伝子を含むコスミドクロンを選択した。P C R には、酵素として P f u D N A ポリメラーゼを用い、各 20 pmol のプライマーを用い、実施例 5（1）と同じ組成の反応液で、反応は 94°C（30 秒）～55°C（30 秒）～72°C（2 分）を 1 サイクルとする 25 サイクルで行った。この結果、No. 172 のコスミドクロンに F 2 遺伝子が含まれることが分かった。

(2) F 2 遺伝子のサブクローニング

実施例4のNhe I/Xba I及びXho I/Sal IカセットDNAのそれぞれ1 μ lを鋳型に、プライマーとして各20 pmolずつのF2S3とカセットプライマーC2又はF2S4とカセットプライマーC2を用いてPCRを行った。PCRは、酵素にPfu DNAポリメラーゼを用い、実施例5(1)と同じ組成の反応液で、94°C(30秒)~55°C(30秒)~72°C(3分)を1サイクルとする50サイクル反応を行った。その結果、F2S3及びカセットプライマーC2のプライマー対では、Nhe I/Xba I及びXho I/Sal IカセットDNAのそれぞれについて約700及び約1400bpのDNA断片が増幅したが、F2S4及びカセットプライマーC2のプライマー対ではDNAの増幅は見られなかった。これにより、Nhe I及びXho Iサイトは、F2S4プライマーのアニーリングする位置からPfu DNAポリメラーゼで増幅できない距離にあると予想された。

そこで、No. 172をNhe Iで消化して得られる種々のDNA断片を切り出し、プラスミドベクターpTV118N(宝酒造社製)にサブクローニングした。得られたそれぞれの組換えプラスミドを鋳型に、F2S3及びF2S4をプライマーに用いてPCRを行ってF2遺伝子が存在するかどうかを調べたところ、約8kbのNhe I断片にF2遺伝子が存在することが判明した。そこでこのNhe I断片がpTV118Nに組み込まれたものをプラスミドpF2172Nhと命名した。また、このプラスミドに含まれる挿入DNA断片について制限酵素地図を作成したところ、図5に示すような結果が得られた。

図5に示した制限酵素地図をもとに、プラスミドpF2172NhをHind IIIで消化して、約1.5kbのHind III断片を切り出し、プラスミドベクターpTV118Nにサブクローニングした。得られた組換えプラスミドについて、F2遺伝子の挿入方向を調べたところ、すべてベクターのlacプロモーターに対して逆方向に挿入されていた。このプラスミドをpF2172H16と命名した。このプラスミドで形質転換された大腸菌JM109、Escherichia coli J

M109 / pF2172H16についてF 2の発現を調べたが、高発現していなかった。そこで、F 2遺伝子をベクターに対して正方向に連結するために、pF2172H16をHindIII及びEcoRIで消化し、切り出されたHindIII-EcoRI断片をプラスミドベクターpTV119Nd（宝酒造社製のプラスミドベクターpTV119NのNcoIサイトをNdeIに変換したもの）に連結した。得られた組換えプラスミドを、pF2172HE11と命名し、このプラスミドで形質転換された大腸菌JM109をEscherichia coli JM109 / pF2172HE11と命名した。

(3) F 2標品の調製

実施例6(2)で得られたEscherichia coli JM109 / pF2172HE11を、1 mMのIPTG及び100 µg/mlのアンピシリンを含む2リットルのLB培地中で16時間培養した。集菌後、菌体を23.4 mlのソニケーションバッファーに懸濁し、実施例2(1)と同様の方法で19.5 mlの熱処理上清液を得た。次に、この溶液をバッファーDで平衡化したRESOURCE Qカラムに供し、FPLCシステムを用いてクロマトグラフィーを行った。F 2は、RESOURCE Qカラムを素通りした。

素通りしたF 2画分2.2 mlを、バッファーDで平衡化したRESOURCE Sカラム（ファルマシア社製）に供した。FPLCシステムを用いて、0～500 mM NaCl直線濃度勾配により溶出し、170 mM NaClのところに溶出されたF 2画分を得た。この画分をセントリコン-10によって濃縮し、得られた75 µlの濃縮液を2 mM 2-メルカプトエタノール、75 mM 塩化ナトリウムを含む50 mM トリス-塩酸バッファー（pH 8.0）で平衡化したSuperdex 200ゲル濾過カラムに供した。同じバッファーで溶出を行った結果、F 2は約120キロダルトン又は約45キロダルトンの分子量に相当する位置に溶出された。この分子量は、F 2が6又は2量体を形成した場合に

相当する。

(4) F 2 遺伝子を含むDNA断片の塩基配列の決定

上記プラスミド p F 2 1 7 2 H E 1 1 の挿入DNA断片の塩基配列をジデオキシ法によって決定した。配列表の配列番号：25に得られた塩基配列のうち957bpの配列を示す。該塩基配列を解析した結果、F 2 のN末端アミノ酸配列を有するオープンリーディングフレームが見い出された。このオープンリーディングフレームの塩基配列を配列表の配列番号：26に、また、該塩基配列から推定されるF 2 の翻訳産物のアミノ酸配列を配列表の配列番号：27にそれぞれ示す。このアミノ酸配列について、既知のタンパク質のアミノ酸配列とのホモロジーを検索したところ、相同性のあるタンパク質は見られなかった。

実施例 7

(1) F 4 遺伝子を含むコスミドクロンの選択

実施例 3 で得られた F 4 の N 末端アミノ酸配列をもとに、配列表の配列番号：28 及び 29 にその塩基配列を示すプライマー F 4 - 1 及び F 4 - 2 を合成した。実施例 4 の H i n d I I I カセット DNA 1 μ l を鋳型として、100 pmol のプライマー F 4 - 1 及び 20 pmol のカセットプライマー C 1 を用いて、1 回目の P C R を行い、その反応液 1 μ l を鋳型として F 4 - 2 及びカセットプライマー C 2 を用いて 2 回目の P C R を行った。P C R は、酵素に P f u DNA ポリメラーゼを用い、実施例 5 (1) と同じ組成の反応液で、反応は 94 $^{\circ}$ C (30 秒) \sim 45 $^{\circ}$ C (30 秒) \sim 72 $^{\circ}$ C (2 分) を 1 サイクルとして、1 回目を 30 サイクル、2 回目を 25 サイクルで行った。この反応により、増幅した約 1100 bp の DNA 断片をプラスミドベクター p U C 1 1 9 にサブクローニングし、M4 及び R V プライマー (宝酒造社製) を用いたジデオキシ法によりその塩基配列の一部を決定した後、得られた配列をもとに配列表の配列番号：30 及び 31 にその塩基

配列を示すプライマーF 4 S 1及びF 4 S 2を合成した。このF 4 S 1及びF 4 S 2プライマーを用いて、実施例1で調製したコスミドDNAを鋳型にPCRを行い、F 4遺伝子を含むコスミドクローンを選択した。PCRには、酵素としてP f u DNAポリメラーゼを用い、実施例5(1)と同じ組成の反応液で、94℃(30秒)～55℃(30秒)～72℃(1分)を1サイクルとする30サイクルの反応を行った。この結果、No. 16、26、88、112、250、269、427及び451のコスミドクローンにF 4遺伝子が含まれることがわかった。

(2) F 4遺伝子のサブクローニング

実施例4のX b a IカセットDNA 1 μ lを鋳型に、各20 pmolずつのF 4 S 2及びカセットプライマーC 2を用いてPCRを行った。PCRは、酵素にP f u DNAポリメラーゼを用い、実施例5(1)と同じ組成の反応液で、94℃(30秒)～55℃(30秒)～72℃(3分)を1サイクルとした50サイクルの反応を行った。その結果、F 4 S 2とカセットプライマーC 2で約700 bpのDNA断片が増幅した。また、H i n d III カセットDNAを鋳型に、F 4-2とカセットプライマーC 2を用いて、同様の条件でPCRを行ったところ、約1100 bpのDNA断片が増幅した。これらのことから、約1.6 kbのX b a I-H i n d III断片にF 4遺伝子が存在することが予想された。そこで、コスミドNo. 16をX b a I及びH i n d IIIで消化し、1.6 kb前後のDNA断片を切り出し、p T V 1 1 8 Nベクターにサブクローニングした。得られたそれぞれの組換えプラスミドを鋳型に、F 4 S 1及びF 4 S 2プライマーを用いたPCRにより、F 4遺伝子の有無を調べた。その結果、F 4遺伝子を含む1.6 kbのX b a I-H i n d III断片を有するプラスミドが得られ、これをプラスミドp F 4-1-4と命名した。また、このプラスミドについて、N c o I、E c o R I、B a m H I、P s t I、S a c I及びN d e Iの制限酵素消化を行ったとこ

ろ、該プラスミド又は挿入DNA断片中にはこれらのサイトがないことが判明した。

(3) F4 遺伝子を含むDNA断片の塩基配列の決定

上記プラスミド pF4-1-4 の挿入DNA断片の塩基配列を、ジデオキシ法によって決定した。

配列表の配列番号：32に得られた塩基配列のうち1012bpの配列を示す。該塩基配列を解析した結果、F4のN末端アミノ酸配列を有するオープンリーディングフレームが見い出された。このオープンリーディングフレームの塩基配列を配列表の配列番号：33に、また、該塩基配列から推定されるF4の翻訳産物のアミノ酸配列を配列表の配列番号：34にそれぞれ示す。このアミノ酸配列について、既知のタンパク質のアミノ酸配列とのホモロジーを検索したところ、相同性のあるタンパク質は見られなかった。

(4) F4を発現するためのプラスミドの構築

実施例7(3)に記載のプラスミド pF4-1-4 を鋳型とし、配列表の配列番号：35にその塩基配列を示すプライマー F4NNd 及び配列表の配列番号：36にその塩基配列を示すプライマー F4CEc を用いて、Pfu DNAポリメラーゼにより、実施例5(1)と同じ組成の反応液でPCRを行った。反応条件を以下に示す：1ngの鋳型DNA、2.0pmolずつの両プライマーを使用、94℃(30秒)～55℃(30秒)～72℃(2分)を1サイクルとする25サイクル反応。増幅された約450bpのDNA断片を、NdeI及びEcoRI(ともに宝酒造社製)で消化して、得られたDNA断片を上記のプラスミドベクター pTV119NdのNdeI及びEcoRI間に組み込んだプラスミド pF4Nd-6 を作製した。さらに、該プラスミド中の挿入DNA断片はジデオキシ法で塩基配列を確認し、PCRに起因する変異のないことを確認した。

(5) 精製F4標品の調製

実施例7(4)で得られたプラスミドpF4Nd-6で形質転換された大腸菌JM109、*Escherichia coli* JM109 / p4Nd-6を、100 μ g/mlのアンプシリンを含む2リットルのLB培地中で16時間培養した。集菌後、菌体を33.4mlのソニケーションバッファーに懸濁し、実施例2(1)と同様の方法で28mlの熱処理上清液を得た。次に、この溶液をバッファーDで平衡化したRESOURCE Qカラムに供し、FPLCシステムを用いてクロマトグラフィーを行った。溶出は、0~500mMのNaCl直線濃度勾配により行った。F4は325mM NaClの濃度で溶出された。

F4画分を集めて得られた3mlの溶液を、PD-10カラムで150mM NaClを含むバッファーDに置換し、6.9mlの溶液を同じバッファーで平衡化したHiTrap Heparin カラムに供した。F4は、HiTrap Heparin カラムに吸着されず、カラムを素通りしたF4画分7.2mlに最終濃度1Mになるように $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ を添加した。この溶液を、1M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ を含むバッファーDで平衡化したHiTrap Phenyl カラム(ファルマシア社製)に供した。FPLCシステムを用いて、1M、0.5M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ でそれぞれカラムを洗浄後、バッファーDでF4を溶出した。この画分5mlをセントリコン-10により濃縮し、得られた76 μ lの濃縮液を2mM 2-メルカプトエタノール、75mM NaClを含む50mM トリス-塩酸バッファー、pH8.0で平衡化したSuperdex 200ゲル濾過カラムに供した。同じバッファーで溶出を行った結果、F4は分子量約39キロダルトンに相当する位置に溶出された。この分子量は、F4が2もしくは3量体を形成した場合に相当する。

実施例8

(1) F 7 遺伝子を含むコスミドクローンの選択

実施例 3 で得られた F 7 の N 末端アミノ酸配列をもとに、配列表の配列番号 : 3 7 及び 3 8 にその塩基配列を示すプライマー F 7 - 1 及び F 7 - 2 を合成した。実施例 4 で調製した H i n d I I I カセット DNA 1 μ l を鋳型として、1 0 0 p m o l の F 7 - 1 及び 2 0 p m o l のカセットプライマー C 1 を用いて、1 回目の P C R を行い、その反応液 1 μ l を鋳型として、1 0 0 p m o l のプライマー F 7 - 2 及び 2 0 p m o l のカセットプライマー C 2 を用いて、2 回目の P C R を行った。反応液の組成及び反応条件は実施例 6 (1) と同様に行った。増幅した約 8 3 0 b p の DNA 断片を、プラスミドベクター p U C 1 1 9 にサブクローニングし、塩基配列を決定した後、得られた配列をもとに配列表の配列番号 : 3 9 及び 4 0 にその塩基配列を示すプライマー F 7 S 1 及び F 7 S 2 を合成した。これらのプライマーを用いて、実施例 1 に示したコスミド DNA を鋳型に P C R を行い、F 7 遺伝子を含むコスミドクローンを選択した。P C R は、酵素として P f u DNA ポリメラーゼを用い、実施例 5 (1) と同じ組成の反応液で、反応は 9 4 $^{\circ}$ C (3 0 秒) \sim 5 5 $^{\circ}$ C (3 0 秒) \sim 7 2 $^{\circ}$ C (3 分) を 1 サイクルとする 3 0 サイクルで行った。この結果、No. 1 5 、 9 6 、 1 1 4 、 1 6 7 、 2 7 7 、 3 4 8 、 3 8 6 、 4 0 0 、 4 1 9 、 4 5 6 、 4 5 7 及び 4 8 4 のコスミドクローンに F 7 遺伝子が含まれることがわかった。

(2) F 7 遺伝子のサブクローニング

実施例 4 で調製した H i n d I I I カセット DNA 1 μ l を鋳型に、各 2 0 p m o l ずつの F 7 S 2 及びカセットプライマー C 2 を用いて P C R を行った。P C R は、酵素に P f u DNA ポリメラーゼを用い、実施例 5 (1) と同じ組成の反応液で、9 4 $^{\circ}$ C (3 0 秒) \sim 5 5 $^{\circ}$ C (3 0 秒) \sim 7 2 $^{\circ}$ C (3 分) を 1 サイクルとした 5 0 サイクルの反応とした。その結果、約 9 0 0 b p の断片が増幅され、また、この結果と実施例 8 (1) の F 7 - 2 及びカセットプライマー C 2 での増幅の結

果とから、約1.0 kbのHindIII断片にF7遺伝子が存在することが予想された。そこで、同遺伝子を含むコスミドから任意に選り出したNo. 15をHindIIIで消化し、1.0 kb前後のDNA断片を切り出してプラスミドベクターpTV118Nにサブクローニングした。得られたそれぞれの組換えプラスミドを鋳型に、F7S1及びF7S2プライマーを用いたPCRにより、F7遺伝子の有無を調べたところ、1 kbのHindIII断片にF7遺伝子が含まれることが判明した。このDNA断片中のF7遺伝子がpTV118Nベクターのlacプロモーターの下流につながったプラスミドをpF7-HH-18、逆方向につながったプラスミドをpF7-1-8とそれぞれ命名した。また、このプラスミドに含まれる挿入DNA断片について、制限酵素地図を作成したところ、図6に示すような地図が得られた。

(3) F7遺伝子を含むDNA断片の塩基配列の決定

上記の2種のプラスミドならびにこれらのプラスミドより切りだしたBamHI-HindIII、NdeI-HindIII、HindIII-NdeI及びHindIII-BamHI断片を、それぞれプラスミドベクターpTV119Ndにサブクローニングしたプラスミドを作製し、その挿入部分の塩基配列をジデオキシ法により決定した。これらの結果を総合して得られた上記のプラスミドの挿入DNA断片の塩基配列のうち、989 bpの配列を配列表の配列番号：41に示す。該塩基配列を解析した結果、F7のN末端アミノ酸配列を含むオープンリーディングフレームが見い出された。このオープンリーディングフレームの塩基配列を配列表の配列番号：2に、また、該配列から推定されるF7の翻訳産物のアミノ酸配列を配列表の配列番号：1にそれぞれ示す。該アミノ酸配列と既知のタンパク質のアミノ酸配列とのホモロジーを検索したところ、真核生物のDNA複製に関与する増殖細胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen: PCNA) [エンボ ジャーナル (EMBO J.)、第11巻、第5111~5120頁 (19

95) ; ヌクレイック アシッズ リサーチ (Nucleic Acids Research) 、第18巻、第261～265頁(1990) ; プロシーディングス オブ ザ ナショナル アカデミー オブ サイエンス オブ ザ USA (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) 、第84巻、第1575～1579頁(1987)] との間に相同性が見られた。各文献に記載のタンパク質との相同性は、それぞれ24、28及び24%であった。

(4) 精製F7標品の調製

実施例8(2)で得られたプラスミドpF7-HH-18で形質転換された大腸菌JM109、Escherichia coli JM109 / pF7-HH-18を、100 μ g/mlのアンピシリンを含む2リットルのLB培地中で16時間培養した。集菌後、菌体を45mlのソニケーションバッファーに懸濁し、実施例2(1)と同様の方法で41.9mlの熱処理上清液を得た。次に、この溶液を、2リットルのバッファーAを外液として2時間の透析を3回行った。透析後の酵素液36mlをバッファーAで平衡化したRESOURCE Qカラムに供し、FPLCシステムを用いてクロマトグラフィーを行った。溶出は、0～500mMのNaCl直線濃度勾配により行った。その結果、F7は340mM NaClのところで溶出された。

F7画分を集めて得られた10mlの溶液を、セントリフロー CF-50を用いて濃縮した後、PD-10カラムで1M (NH₄)₂SO₄を含むバッファーAに置換し、得られた3.5mlの溶液を同じバッファーで平衡化したHiTrap Phenylカラムに供した。FPLCシステムを用いて1M及び、0.5M (NH₄)₂SO₄で順次カラムを洗浄した後、バッファーAでF7を溶出した。この画分4mlをセントリコン-10を用いて濃縮した。この濃縮液80 μ lを、2mM 2-メルカプトエタノール、75mM NaClを含む50mM リン酸カリウムバッファー(pH6.5)で平衡化したSuperdex

200ゲル濾過カラムに供した。同じバッファーで溶出を行った結果、F7は分子量約99キロダルトンに相当する位置に溶出された。この分子量は、F7が3量体を形成した場合に相当する。

(5) プライマー伸長反応に及ぼすF7の効果

F7の各種ポリメラーゼへのプライマー伸長反応に及ぼす効果を調べるために、PfuポリメラーゼC、Pfu DNAポリメラーゼ(α 型DNAポリメラーゼ、ストラタジーン社製)ならびにピロディクティウム オカルタム (Pyrodictium occultum) 由来のPoc DNAポリメラーゼI及びII [Poc DNAポリメラーゼI、及びII、ジャーナル オブ バクテリオロジー (J. Bacteriol.) 第177巻、第2164~2177頁(1995)]の活性を、F7の添加の有無について比較した。

DNAポリメラーゼ活性の測定は、実施例2(1)に記載のPfuポリメラーゼCの活性測定法を参考にして行った。なお、基質には、M13ファージ一本鎖DNA (M13mp18 ssDNA、宝酒造社製)に45塩基の合成オリゴヌクレオチドであるHTプライマーをアニーリングさせたもの(M13-HTプライマー)を使用した。配列表の配列番号: 42にHTプライマーの塩基配列を示す。

すなわち、表2に記載のDNAポリメラーゼ及びF7を含有する最終容量50 μ lの反応液[20mMトリス-塩酸、pH7.7、15mM MgCl₂、2mM 2-メルカプトエタノール、0.01 μ g/ μ l M13-HTプライマー、それぞれ40 μ MのdATP、dCTP、dGTP及びdTTP、60nM [³H]-dTTP (アマシャム社製)]を調製して、75°Cで5分間反応させた。反応液を氷冷して反応を停止させた後、そのうちの40 μ lをDEペーパー(ワットマン社製)にスポットし、5% Na₂HPO₄で洗浄を5回行った後、DEペーパー上に残存する放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定

した。

表2に示すように、使用したすべてのDNAポリメラーゼについて、F 7の添加によるDNAポリメラーゼ活性の上昇が認められた。

表 2

DNA ポリメラーゼ	F 7	酵素活性 (c p m)
ブランク 1	—	6 1
ブランク 2	10pmol	3 5
Pfu ポリメラーゼ C (25fmol)	—	8 8 8
Pfu ポリメラーゼ C (25fmol)	5pmol	2 8 9 7
Pfu ポリメラーゼ C (25fmol)	10pmol	3 1 7 5
Pfu DNA ポリメラーゼ (120fmol)	—	9 0 7
Pfu DNA ポリメラーゼ (120fmol)	0.48pmol	1 3 6 3
Pfu DNA ポリメラーゼ (120fmol)	4.8pmol	1 6 3 7
Poc DNA ポリメラーゼ I (74pmol)	—	6 2
Poc DNA ポリメラーゼ I (74pmol)	10pmol	6 9
Poc DNA ポリメラーゼ II (6.0pmol)	—	4 3 3
Poc DNA ポリメラーゼ II (6.0pmol)	10pmol	1 4 4 3

注：表中の P f u ポリメラーゼ C の量は 2 つの DNA ポリメラーゼ構成タンパク質 1 分子ずつからなるタンパク質として、また、F 7 の量は 3 量体タンパク質としての量を示す。

さらにプライマー伸長活性について詳細な検討を行った。基質として M 1 3 - HT プライマーを用い、プライマーの 5' 末端を $[\gamma - ^{32}\text{P}] - \text{ATP}$ (アマシ

ヤム社製)とT4ポリヌクレオチドキナーゼ(宝酒造社製)によって標識して使用した。

以下の試料を含む1 μ l の試料液を調製した: ①18 fmolのPfuポリメラーゼC、②18 fmolのPfuポリメラーゼC+2 pmolのF7、③0.24 pmolのPfu DNAポリメラーゼ、④0.24 pmolのPfu DNAポリメラーゼ+0.78 pmolのF7。これらの試料液に、それぞれ0.01 μ g/ μ l の³²P標識M13-HTプライマーを含む9 μ l の反応液(20 mM トリス-塩酸(pH 9.0)、15 mM MgCl₂、2 mM 2-メルカプトエタノール、それぞれ40 μ MのdATP、dGTP、dCTP及びdTTP)を添加し、75℃で2.5分間又は5分間反応させた。反応終了後、反応液を氷冷して反応を停止し、さらに1 μ l の200 mM EDTA、5.5 μ l の反応停止液(95%ホルムアミド、20 mM EDTA、0.05%プロモフェノールブルー、0.05%キシレンシアノール)を加えて、95℃、5分間の熱変性処理を行った。この反応液のうち1.6 μ l を、8 M尿素を含む6%ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動した後、オートラジオグラムを作製した。得られたオートラジオグラムを図7に示す。

図中、Pfu-C及びp fuは、それぞれPfuポリメラーゼC及びPfu DNAポリメラーゼについて得られた結果を示し、2.5及び5はそれぞれ反応時間(分)を示す。また、図中-及び+の表示は、それぞれF7非添加及び添加の反応液で得られた結果を示す。さらに、図中両端のレーンは、 λ -EcoT14 I消化物(宝酒造社製)を[γ -³²P]-ATP(アマシャム社製)とT4ポリヌクレオチドキナーゼ(宝酒造社製)を用いて5'末端標識したものを電気泳動した結果であり、伸長産物の長さを推定するのに使用した。

図7に示されるように、F7を添加しない場合、PfuポリメラーゼCでは300~600塩基程度のDNAが主な伸長産物であるのに対し、F7が添加された場合には低鎖長の伸長産物が減少するとともに1000塩基を超える伸長産物

の割合が増加している。また、Pfu DNAポリメラーゼでも、F7の添加によって伸長産物の鎖長が著しく延長されていた。こうして、F7がPfuポリメラーゼC及びPfu DNAポリメラーゼ双方のプライマー伸長速度を増大させることが明らかとなった。

次に、より高分子のプライマー伸長反応物を解析するために、 ^{32}P 標識M13-HITプライマーを基質としたときのPfuポリメラーゼC及びPfu DNAポリメラーゼのプライマー伸長反応物を、アルカリアガロースゲル電気泳動によって解析した。上記の①～④の試料液各1 μl に、終濃度0.01 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ のM13-HITプライマーを含む9 μl の反応液(20 mM トリス-塩酸、pH 9.0、15 mM MgCl_2 、2 mM 2-メルカプトエタノール、それぞれ40 μM のdATP、dGTP、dCTP及びdTTP、84 nM [α - ^{32}P]-dCTP)を添加し、75℃で2.5分間反応させた。反応終了後、氷冷した反応液に1.11 μl の200 mM EDTA、1.23 μl の500 mM NaOH、2.47 μl の6倍濃度ローディングバッファー(0.125% ブロモフェノールブルー、0.125% キシレンシアノール、9% グリセロール)を順次添加し、そのうち6 μl を0.5% アルカリアガロースゲルを用いて電気泳動した後、オートラジオグラムを作製した。得られたオートラジオグラムを図8に示す。

図中、Pfu-C及びpfuは、それぞれPfuポリメラーゼC及びPfu DNAポリメラーゼについて得られた結果を示し、図中、-及び+の表示はそれぞれF7非存在下及び存在下で得られた結果を示す。さらに、図中、Mのレーンは、上記同様に末端標識された λ -EcoT14I消化物である。図8に示されるように、PfuポリメラーゼCの場合、F7非存在下では2.5 kb付近に伸長産物の弱いシグナルが見られるのに対し、F7存在下ではM13 ssDNAを完全に一周した7.3 kbのシグナルが見られた。また、Pfu DNAポリメラーゼではF7存在下で2.7 kb付近にシグナルが見られるが、F7非存在下では

シグナルは見られなかった。以上のことから、F 7は両DNAポリメラーゼの伸長反応を高めることが示された。

実施例 9

(1) RFC 小サブユニットのホモログをコードする遺伝子を含むコスミドクローンの選択

メタノコッカス ジャナシ (*Methanococcus jannaschii*) の RFC 小サブユニットのアミノ酸配列 [サイエンス (Science)、第 273 巻、第 1058~1073 頁 (1996)] について、他の生物由来の RFC (RF-C) 小サブユニットのアミノ酸配列とのホモロジーを調べ、これらの間でよく保存されている領域のアミノ酸配列から RFC 小サブユニットをコードする遺伝子を探索するためのプライマー RF-F1、RF-F3、RF-F4、RF-R1、RF-R2、RF-R3 及び RF-R4 を合成した。配列表の配列番号：43~49 に、それぞれこれらのプライマーの塩基配列を示す。これらのプライマーを組み合わせ、ピロコッカス フリオサスのゲノム DNA を鋳型とした PCR を行い、RFC 小サブユニットをコードする遺伝子の探索を行った。この PCR には、Pfu DNA ポリメラーゼを用い、0.25 μ g の鋳型 DNA 及び各 100 pmol ずつのプライマーを用いて、実施例 5 (1) と同様の組成の反応液で行った。RF-F1 及び RF-R4 で 1 回目の PCR を行った場合は、この反応液 1 μ l ずつを鋳型として RF-F4 及び RF-R4、又は RF-F1 及び RF-R1 を用いた 2 回目の PCR を、また、RF-F1 及び RF-R3 で 1 回目の PCR を行った場合には、反応液 1 μ l ずつを鋳型として RF-F3 及び RF-R2 を用いた 2 回目の PCR を行い、それぞれ約 240 bp、約 140 bp 及び約 140 bp の増幅 DNA 断片を得た。これらの DNA 断片をそれぞれプラスミドベクター pUC119 にサブクローニングし、その塩基配列を決定した後、得られた配列を参考に、配列表の配列番号：50~54 にそれぞれ塩基配列を示すプライマー RF-

S1、RF-S2、RF-S3、RF-S4及びRF-S5を合成した。このRF-S1及びRF-S3プライマーを用いて、実施例1で調製したコスミドDNAを鋳型にPCRを行い、RFC小サブユニットのホモログをコードする遺伝子を有すると考えられるコスミドクローンを選択した。PCRには、TaKaRa PCRアンプリフィケーションキットを用い、反応は94℃(30秒)～55℃(30秒)～72℃(2分)を1サイクルとした25サイクルで行った。この結果、No. 254、310、313、377及び458のコスミドクローンに目的の遺伝子(PFU-RFC遺伝子)が含まれることがわかった。

(2) PFU-RFC遺伝子のサブクローニング

実施例4で調製したXbaI及びEcoRIカセットDNA 1 µgを鋳型に、100 pmolのRF-S1及び20 pmolのカセットプライマーC2、又は100 pmolのRF-S2及び20 pmolのカセットプライマーC2を用いてPCRを行った。PCRは、酵素にPfuポリメラーゼCを用い、実施例6(1)と同様の組成の反応液で、94℃(30秒)～55℃(30秒)～72℃(3分)を1サイクルとする50サイクルの反応を行った。その結果、XbaIカセットを鋳型とした場合に、RF-S1及びカセットプライマーC2で約2 kbのDNA断片が、EcoRIカセットを鋳型とした場合にRF-S2及びカセットプライマーC2で約1.5 kbのDNA断片が増幅した。これらのDNA断片を、それぞれプラスミドベクターpUC119にサブクローニングし、得られた組換えプラスミドをpRFSXS1-26及びpRFSES2-8と命名した。これらのプラスミドの制限酵素地図を作製した結果、NdeI及びBamHIサイトは、PFU-RFC遺伝子内に存在しないことが予想された。

上記(1)の5クローンのコスミドを、それぞれNdeI及びBamHIで消化し、その泳動パターンを調べたところ、5 kb付近に共通するバンドが見られた。このDNA断片にPFU-RFC遺伝子が存在すると予想し、クローンNo.

254由来の約5kbのNde I - BamH I断片を切り出して、上記のpTV119Ndベクターにサブクローニングした。得られた組換えプラスミドによる形質転換体について、RF-S1及びRF-S3プライマーを用いてPCRによりPFU-RFC遺伝子の有無を調べた結果、このNde I - BamH I断片にPFU-RFC遺伝子が存在することが判明した。そこで、このNde I - BamH I断片がpTV119Ndベクターに組み込まれたものをプラスミドpRFS254NdBと命名した。また、このプラスミドについて、制限酵素地図を作製したところ、図9に示すような地図が得られた。

図9に示した制限酵素地図をもとに、pRFS254NdBより以下に示す方法で各断片を切り出し、pTV118Nベクター（宝酒造社製）にサブクローニングした。まず、pRFS254NdBをXba I及びSac Iで消化して得られる約500bpのDNA断片、Xba I及びNco Iで消化して得られる約2kbのDNA断片、ならびにNco I及びBamH Iで消化して得られる約1.1kbのDNA断片をそれぞれ調製し、これらとSac I及びBamH Iで開環したpTV118Nとを混合してライゲーションを行い、組換えプラスミドを構築した。このプラスミドをpRFS254SXNBと命名した。

(3) PFU-RFC遺伝子を含むDNA断片の塩基配列の決定

実施例9(2)で得られたプラスミドpRFS254NdBに含まれる挿入DNA断片について、ジデオキシ法により塩基配列を決定した。配列表の配列番号：55に得られた塩基配列のうち3620塩基対分の配列を示す。この塩基配列よりここにコードされるタンパク質のアミノ酸配列を推定し、これを既知のRFC小サブユニットのものと比較した結果、PFU-RFCのアミノ酸配列中には介在配列(intein)が1つ存在していることが予想された。この介在配列は、配列表の配列番号：55の721番から2295番にコードされている。

(4) 介在配列を除去したPFU-RFC発現用プラスミドの構築

実施例9(3)で得られた塩基配列ならびに既知のRFC 小サブユニットのアミノ酸配列及びそれをコードする遺伝子の塩基配列を参考に、配列表の配列番号: 56及び57に塩基配列を示すプライマーRF-CBΔI及びRF-CAΔIを合成した。この両プライマーの5'末端をリン酸化したものを使用し、上記のプラスミドpRFS254SXNBを鋳型に用いたインバースPCRを行った。インバースPCRには、TaKaRa Ex Taqを使用し、この酵素の使用説明書にしたがって100μlの反応液を調製した。該反応液には、15ngのプラスミドpRFS254SXNB及び20pmolずつのプライマーを添加し、94℃(30秒)~55℃(30秒)~72℃(3分)を1サイクルとする30サイクルの反応を行った。インバースPCRで得られた増幅DNA断片をDNAブラントニングキット(宝酒造社製)を用いて平滑末端にした後、セルフライゲーションさせてプラスミドを構築し、これをプラスミドpRFS254ISΔIと命名した。

さらに、該プラスミドをXbaI及びNcoIで消化して単離された約400bpのXbaI-NcoI断片と、実施例9(2)で得られたプラスミドpRFS254NdBから単離された約500bpのXbaI-SacI断片、約1.1kbのNcoI-BamHI断片とを混合してプラスミドベクターpTV118NのBamHI-SacIサイト間にサブクローニングした。こうして得られた組換えプラスミドをpRFS254SNCと命名した、また、該プラスミドで形質転換された大腸菌JM109を *Escherichia coli* JM109 / pRFS254SNC と命名した。該形質転換体は、PFU-RFCを高発現することが判明した。

(5) 介在配列を含まないPFU-RFCをコードする遺伝子の塩基配列の決定

実施例9(4)で得られたプラスミドpRFS254SXNB由来の約400bpのXbaI-NcoI断片を、プラスミドベクターpTV118Nベクター

にサブクローニングして、その挿入DNA断片の塩基配列を決定することにより、除去された介在配列の境界部分をコードする塩基配列を確認した。この結果及び実施例9(3)の結果から、介在配列を含まないPFU-RFCをコードする遺伝子の塩基配列を決定した。こうして得られた介在配列を含まないPFU-RFCをコードするオープンリーディングフレームの塩基配列及び該塩基配列から推定されるPFU-RFCのアミノ酸配列を、それぞれ配列表の配列番号：4、及び3に示す。

(6) 精製PFU-RFC標品の調製

実施例9(4)で得られた *Escherichia coli* JM109 / pRFS254Snc を100 μ g / mlのアンピシリンを、含む2リットルのLB培地中で16時間培養した。集菌後、菌体を44.1 mlのソニケーションバッファーに懸濁し、実施例2(1)と同様の方法で35.2 mlの熱処理上清液を得た。次に、この溶液をバッファーDで平衡化したRESOURCE Qカラムに供し、FPLCシステムを用いてクロマトグラフィーを行った。PFU-RFCはRESOURCE Qカラムを素通りした。

素通りしたPFU-RFC画分35 mlを、バッファーDで平衡化したRESOURCE Sカラム(ファルマシア社製)に供した。FPLCシステムを用いて0~500 mM NaCl直線濃度勾配により溶出し、170 mM NaClのところ溶出されたPFU-RFC画分を得た。この画分2.9 mlをセントリコン-10によって濃縮し、得られた105 μ lの濃縮液を2 mM 2-メルカプトエタノール、75 mM 塩化ナトリウムを含む50 mM トリス-塩酸バッファー、pH 8.0で平衡化したSuperdex 200ゲル濾過カラムに供した。同じバッファーで溶出を行った結果、PFU-RFCは、約150キロダルトンの分子量に相当する位置に溶出された。この分子量は、PFU-RFCが4量体を形成した場合に相当する。

(7) プライマー伸長反応に及ぼすPFU-RFCの効果

実施例8(5)と同様の方法でPFU-RFC及びF7の存在がPfuポリメラーゼCのプライマー伸長反応に及ぼす効果について調べた。表3にその結果を示す。表3に示されるように、PFU-RFCはPfuポリメラーゼCの活性を若干促進している。さらに、F7と同時にPFU-RFCを添加した場合には、F7を単独で添加した場合に比べて2倍以上の活性促進が見られた。

表3

PfuポリメラーゼC	F7	PFU-RFC	酵素活性 (cpm)
—	—	—	100
90 fmol	—	—	366
90 fmol	9.6 pmol	—	2743
90 fmol	—	356 fmol	463
90 fmol	9.6 pmol	356 fmol	8740

注：表中のPfuポリメラーゼCの量は2つのDNAポリメラーゼ構成タンパク質1分子ずつからなるタンパク質として、また、F7、PFU-RFCの量はそれぞれ3量体、4量体タンパク質としての量を示す。

実施例10

(1) 抗Pfu DNAポリメラーゼ抗体の調製

12ml(30,000ユニット)のcloned Pfu DNAポリメラーゼ(ストラタジーン社製)をセントリコン-10を用いた限外ろ過により濃縮した後、得られた0.1mlの濃縮液を2mM 2-メルカプトエタノール、7

5 mM NaClを含む50 mM トリス-塩酸 (pH 8.0) で平衡化した Superdex 200 ゲル濾過カラム (ファルマシア社製) に供した。同じバッファーにより溶出し、約76 キロダルトンの分子量に相当する位置に溶出された Pfu DNAポリメラーゼ画分を回収した。この画分0.8 ml をセントリコン-10 により濃縮し、この濃縮液を抗原として抗Pfu DNAポリメラーゼポリクローナル抗体の調製に用いた。Pfu DNAポリメラーゼの濃度が2 mg/ml となるよう上記の濃縮液を生理食塩水で希釈し、これに等量の完全フロイント・アジュバントを加えて乳化させた。これを1回250 μ l、3週間おきに4回ウサギ皮下に注射した。最終免疫より10日後に全血を採取し、これを室温に60分間放置した後、遠心分離して抗Pfu DNAポリメラーゼポリクローナル抗体を含む抗血清60 mlを得た。この抗血清26 mlに26 mlの飽和硫酸アンモニウム溶液を添加し、4℃で1時間45分間、ゆるやかに攪拌後遠心分離した。沈殿を5 mlの20 mM リン酸ナトリウムバッファー (pH 7.0) に懸濁し、同じバッファーで平衡化したPD-10カラム (ファルマシア社製) で脱塩を行った。この溶液10 mlを20 mM リン酸ナトリウムバッファー (pH 7.0) で平衡化したプロテインAカラム (ファルマシア社製) に供し、同バッファーで洗浄した後、0.1 M クエン酸ナトリウムバッファー (pH 3.0) で溶出した。溶出した抗Pfu DNAポリメラーゼポリクローナル抗体を含む画分を、1 M トリス-塩酸、pH 9.0で中和した後、セントリフローCF-50で濃縮し、PD-10カラムでカップリングバッファー (0.5 M 塩化ナトリウム、0.2 M 重炭酸ナトリウム、pH 8.3) に置換して抗Pfu DNAポリメラーゼ抗体を含む溶液を調製した。

(2) 抗Pfu DNAポリメラーゼ抗体カラムの作製

HiTrap NHS-activatedカラム (ファルマシア社製) を1 mM 塩酸 6 mlで洗浄した後、上記の抗Pfu DNAポリメラーゼポリクロ

ーナル抗体溶液 0.9 ml (4.5 mg 相当の抗 P f u DNA ポリメラーゼ抗体を含む) をアプライした。以降実施例 2 (3) と同様の方法により、抗 P f u DNA ポリメラーゼ抗体カラムを調製した。

(3) 抗 P f u DNA ポリメラーゼ抗体カラムを用いた P f u DNA ポリメラーゼと F 7 複合体形成の確認

ピロコッカス・フリオサス DSM 3638 を実施例 1 記載の方法と同様に培養し、培養液 9 リットル分の菌体を得た。この菌体を 33 ml の 2 mM PMSF を含むバッファー C (50 mM トリス-塩酸、pH 8.0、1 mM ATP) に懸濁し、超音波破碎機にかけた。得られた破碎液を 12000 rpm、10 分間遠心し、得られた上清 44 ml をバッファー C で平衡化した抗 P f u DNA ポリメラーゼ抗体カラムに供した。カラムを 0.1 M NaCl を含むバッファー C で洗浄した後、溶出バッファー (50 mM トリス-塩酸 pH 8.0、8 M 尿素) で P f u DNA ポリメラーゼ複合体を溶出し、この溶出液を SDS-PAGE (12.5% ポリアクリルアミドゲル、泳動緩衝液として 25 mM トリス-塩酸、192 mM グリシン、0.1% SDS、pH 8.4 を使用) に供した。泳動後のゲルを常法に従いクマシーブリリアントブルー R-250 で染色した結果、図 10 に示すように、P f u DNA ポリメラーゼのバンド以外に上記の F 7 に相当する位置にバンドが検出された。

そこで、この溶出液の濃縮液を上記同様に SDS-PAGE に供し、得られたゲルについて実施例 3 (2) と同様の方法で抗 P f u DNA ポリメラーゼ抗体を用いたウェスタンブロッティングを行った。図 10 に示す SDS-PAGE の結果及び上記のウェスタンブロッティングとの結果から、F 7 に相当する位置のバンドが抗 P f u DNA ポリメラーゼ抗体と反応しないタンパク質であることが明らかとなった。

さらに、このバンドに存在するタンパク質の N 末端アミノ酸配列を実施例 3 (

2)と同様の方法で分析したところ、このタンパク質がF 7であることが判明した。

(4) ゲル濾過クロマトグラフィーを用いたP f u DNAポリメラーゼとF 7との複合体形成の確認

実施例8(4)で得られたF 7標品1.2mlを、PD-10カラムを用いて2mM 2-メルカプトエタノール、75mM NaClを含む50mM トリス-塩酸(pH 8.0)にバッファー置換した後、セントリコン-10を用いて50 μ lに濃縮した。

実施例10(1)記載のP f u DNAポリメラーゼ 0.1mMの溶液、上記のF 7 0.1mM(3量体として計算)の溶液、及びP f u DNAポリメラーゼ 0.1mMとF 7 0.1mMとの混合物それぞれ10 μ lずつを、60℃から90℃まで30分かけて加熱した。加熱処理したそれぞれの溶液を、2mM 2-メルカプトエタノール、75mM 塩化ナトリウムを含む50mM トリス-塩酸バッファー、pH 8.0で平衡化したSuperdex 200 PC3.2/30ゲル濾過カラム(ファルマシア社製)に供し、同じバッファーで溶出を行った。P f u DNAポリメラーゼ及びF 7は、それぞれ約76キロダルトン及び約128キロダルトンの分子量に相当する位置に溶出された。これに対し、P f u DNAポリメラーゼとF 7の混合物の場合には、約320キロダルトンに相当するメインピーク及び約128キロダルトンに相当するマイナーピークとして溶出された。この2つのピークを有する画分を、それぞれSDS-PAGE(12.5% ポリアクリルアミドゲル、泳動緩衝液として25mM トリス-塩酸、192mM グリシン、0.1% SDS、pH 8.4を使用)に供したところ、約320キロダルトンに相当する画分にはP f u DNAポリメラーゼ及びF 7とが、また、約128キロダルトンに相当する画分にはF 7のみが含まれていた。このことにより、P f u DNAポリメラーゼとF 7とが複

合体を形成していることが判明した。

(5) Pfu DNAポリメラーゼ-F7複合体の伸長活性

実施例10(4)記載のゲル濾過において、約76キロダルトンに相当するPfu DNAポリメラーゼ単独及び320キロダルトンに相当するPfu DNAポリメラーゼとF7との混合体のゲル濾過により得られた溶出液を20 μ lずつ分取し、それぞれについて実施例8(5)に示した非標識M13-HTプライマーを基質とした活性測定方法によってプライマー伸長活性を測定した。また、同時に実施例2(1)記載の活性化DNAを基質とした方法で取り込み活性の測定を行った。この結果を図11に示す。両画分について取り込み活性に対するプライマー伸長活性の比率を調べたところ、約320キロダルトン画分で0.65、約76キロダルトン画分で0.29という値が得られ、F7との複合体形成によってPfu DNAポリメラーゼのプライマー伸長活性が促進されることが判明した。

実施例11

(1) RFC 大サブユニットのホモログをコードする遺伝子を含むコスミドクローンの選択

メタノコッカス ジャナシ (*Methanococcus jannaschii*) のRFC 大サブユニットのアミノ酸配列 [サイエンス (Science)、第273巻、第1058~1073頁 (1996)] について、実施例9に記載の介在配列を含まないPFU-RFC小サブユニットのアミノ酸配列とのホモロジーを調べ、これらの間でよく保存されている領域のアミノ酸配列を参考に、RFC 大サブユニットをコードする遺伝子を探索するためのプライマーRFLS15を合成した。配列表の配列番号: 60にプライマーRFLS15の塩基配列を示す。このプライマーと、RFCの両サブユニットタンパク質に存在する類似アミノ酸配列に対応する上記

のプライマーRF-F1とを組み合わせ、ピロコッカス フリオサスのゲノムDNAを鋳型としたPCRを行った。このPCRには、Pfu DNAポリメラーゼを用い、0.25 μ gの鋳型DNA及び各100 pmolずつのプライマーを用いて、実施例5(1)と同様の組成の反応液で行った。このPCRにより増幅された2種のDNA断片のうち、PFU-RFC小サブユニット遺伝子由来の増幅産物について予想されるものとはサイズの異なる約630 bpの増幅DNA断片を単離した。このDNA断片をプラスミドベクターpUC119にサブクローニングし、その塩基配列を決定した後、得られた塩基配列を参考に配列表の配列番号：61及び62にそれぞれ塩基配列を示すプライマーRFLS-S3及びRFLS-S4を合成した。

この両プライマーを用いて、実施例1で調製したコスミドDNAを鋳型にPCRを行い、RFC 大サブユニットのホモログをコードする遺伝子を有すると考えられるコスミドクローンを選択した。PCRには、酵素にPfu DNAポリメラーゼを用い、実施例5(1)と同様の組成の反応液で、94℃(30秒)～55℃(30秒)～72℃(2分)を1サイクルとする30サイクルの反応を行った。この結果、No. 254、310、313、377及び458のコスミドクローンに目的の遺伝子(PFU-RFCLS遺伝子)が含まれることがわかった。これらの番号のコスミドクローンは、上記のPFU-RFC遺伝子が含まれるコスミドクローンと一致していた。そこで、配列表の配列番号：55に示されたプラスミドpRFS254NdBの挿入DNA断片の塩基配列を調べたところ、PFU-RFC遺伝子のすぐ下流にあたる該配列の3109番から始まるオープンリーディングフレームに、RFC 大サブユニットのホモログ(PFU-RFCLS)がコードされていることが判明した。しかしながら、このプラスミドpRFS254NdBには、PFU-RFCLS遺伝子の全長は保持されていないかった。

(2) PFU-RFCLS遺伝子のサブクローニング

PFU-RFCLS遺伝子全長を含むDNA断片を単離するため、上記のクローンNo. 254をNhe Iで消化し、得られた種々のDNA断片を切り出し、プラスミドベクターpTV118N（宝酒造社製）にサブクローニングした。得られたそれぞれの組換えプラスミドを鋳型に、RFLS-S3及びRFLS-S4をプライマーに用いてPCRを行い、PFU-RFCLS遺伝子が存在するかどうかを調べたところ、約11kbのNhe I断片にRFLS遺伝子が存在することが判明した。そこで、このNhe I断片がpTV118Nに組み込まれたものをプラスミドpRFLSNhと命名した。また、このプラスミドに含まれる挿入DNA断片について制限酵素地図を作成したところ、図12に示すような結果が得られた。

さらに、このプラスミドに含まれる挿入DNA断片の塩基配列をジデオキシ法により決定した。得られた塩基配列のうちPFU-RFCLSをコードするオープンリーディングフレーム部分の塩基配列を配列表の配列番号：63に示す。また、該配列から推定されるPFU-RFCLSのアミノ酸配列を配列表の配列番号：64に示す。

実施例12

(1) F5遺伝子を含むコスミドクロンの選択

実施例3で得られたF5のN末端アミノ酸配列をもとに配列表の配列番号：65及び66にそれぞれ塩基配列を示すプライマーF5-1-1及びF5-2を合成した。実施例4で調製したPst IカセットDNA1 μ lを鋳型として、100 pmolずつのF5-1-1及びカセットプライマーC1（宝酒造社製）を用いて1回目のPCRを行い、その反応液1 μ lを鋳型として100 pmolずつのF5-2及びカセットプライマーC2（宝酒造社製）を用いて2回目のPCRを行った。この2回のPCRには、TaKaRa PCRアンプリフィケーションキット

(宝酒造社製)を用い、添付の説明書に従って行った。増幅した約900bpのDNA断片をプラスミドベクターpTV118N(宝酒造社製)にサブクローニングした。得られたプラスミドをpF5P2と命名し、その塩基配列を決定した。その後、得られた配列をもとに、配列表の配列番号:67及び68にそれぞれ塩基配列を示すプライマーF5S1及びF5S2を合成した。このF5S1及びF5S2を用いて実施例1に示したコスミドDNAを鋳型にPCRを行い、F5遺伝子を含むコスミドクローンを選択した。PCRには、TaKaRa PCRアンプリフィケーションキットを用い、添付の説明書に従って行った。この結果、No. 15、96、114、167、277、348、386、400、419、456、457及び484のコスミドクローンに、F5遺伝子が含まれることがわかった。これらの番号のコスミドクローンは、F7遺伝子が含まれるコスミドクローンと一致していた。そこで、配列表の配列番号:41に示された塩基配列を調べたところ、該配列上でF7遺伝子下流にあたる892番以降にF5遺伝子の前半部分が含まれていることが判明した。

(2) F5遺伝子のサブクローニング

F5遺伝子をサブクローニングするために、実施例8で得られたプラスミドpF7-HH-18及び上記のプラスミドpF5P2を用いて、F5遺伝子周辺のNcoI、BamHI、PstI、HindIII及びNdeI(宝酒造社製)の制限酵素地図を作成したところ、図13に示すような結果が得られた。

図13に示した制限酵素地図をもとに、コスミドクローンNo. 15をNdeIで消化して約900bpの断片を切り出し、プラスミドベクターpTV118Ndにサブクローニングした。得られた組換えプラスミドについてF5遺伝子がlacプロモーターに対して正方向に挿入されていたプラスミドをpF5NNF-1と命名した。

(3) F 5 遺伝子を含むDNA断片の塩基配列の決定

上記プラスミド p F 5 NNF - 1 の挿入DNA断片の塩基配列をジデオキシ法によって決定した。得られた塩基配列を解析した結果、そこにコードされるタンパク質のN末端アミノ酸配列がF 5 のものと一致するオープンリーディングフレームが見い出された。このオープンリーディングフレームの塩基配列を配列表の配列番号：69に、また、該塩基配列から推定されるF 5 のアミノ酸配列を配列表の配列番号：70にそれぞれ示す。このアミノ酸配列について既知のタンパク質のアミノ酸配列とのホモロジーを検索したところ、相同性のあるタンパク質は見い出されなかった。

(4) F 5 を発現するためのプラスミドの構築

上記のプラスミド p F 5 NNF - 1 を鋳型とし、配列表の配列番号：71及び72にそれぞれの塩基配列を示すプライマーF 5 Nco及びF 5 C Bamを用いてPCRを行った。このPCRにはPfu DNAポリメラーゼを使用し、実施例5(1)と同じ組成の反応液で行った。1ngの鋳型DNA及び20pmolずつの両プライマーを使用して、94℃(30秒)～55℃(30秒)～72℃(2分)を1サイクルとした25サイクルの反応を行った。増幅された約640塩基対のDNA断片をNcoI及びBamHI(ともに宝酒造社製)で消化し、得られた断片をNcoI及びBamHIで開環したpET15b(ノバジェン社製)とライゲーションした。このプラスミドをpF5NBPETと命名した。該プラスミド中の挿入DNA断片のうち、PCRで増幅した領域はジデオキシ法で塩基配列を確認し、PCRに起因する変異のないことを確認した。

プラスミド p F 5 NBPET で形質転換された大腸菌HMS174(DE3)、Escherichia coli HMS174(DE3)/pF5NBPETについて、F 5 の発現を調べたところ、該形質転換体の培養物中にF 5 に相当する分子量のタンパク質が発現していることが示された。

実施例 13

(1) F3 遺伝子のサブクローニング

実施例3で得られたF3のN末端アミノ酸配列をもとに、配列表の配列番号：73及び74にその塩基配列を示すプライマーF3-1及びF3-3-1を合成した。実施例4のBglII/Sau3AIカセットDNA1 μ lを鋳型として、100 pmolのプライマーF3-1及び20 pmolのカセットプライマーC1を用いて1回目のPCRを行い、その反応液1 μ lを鋳型としてF3-3-1及びカセットプライマーC2を用いて2回目のPCRを行った。PCRは、酵素にPfu DNAポリメラーゼを用い、実施例5(1)と同じ組成の反応液で、反応は94 $^{\circ}$ C(30秒)~45 $^{\circ}$ C(30秒)~72 $^{\circ}$ C(2分)を1サイクルとして1回目を30サイクル、2回目を25サイクルで行った。この反応により増幅した約500 bpのDNA断片を、プラスミドベクターpTV118Nにサブクローニングし、M4及びRVプライマー(宝酒造社製)を用いたジデオキシ法によりその塩基配列の一部を決定した後、得られた配列をもとに配列表の配列番号：75、76、77及び78にその塩基配列を示すプライマーF3S1、F3S2、F3S3及びF3S4を合成した。このF3S1及びF3S2プライマーを用いて実施例1で調製したコスミドDNAを鋳型にPCRを行い、F3遺伝子を含むコスミドクローンを探索したところ、F3遺伝子を含むと考えられるコスミドクローンは見出されなかった。そこで、プライマーF3S3又はF3S4とプライマーC2とを用いて、実施例4の各カセットDNAを鋳型にしたPCRを行い、F3遺伝子周辺の制限酵素認識部位をマッピングした結果より、SalIサイトとHindIIIサイトには含まれた約2.6 kbの断片にF3遺伝子が存在すると予想された。この結果をもとに、ピロコッカス フリオサスのゲノムDNA4 μ gをSalI及びHindIIIで消化した後、2.6 kb前後のDNA断片を分取してpTV118Nベクターにサブクローニングした。こうして得られたそれぞれの組

換えプラスミドを鑄型に、プライマーF 3 S 4 及びプライマーR V - N (宝酒造社製)を用いたPCRによりF 3 遺伝子の有無を調べた。その結果、F 3 遺伝子を含む2.6 kbのS a l I - H i n d I I I 断片を有するプラスミドが得られ、これをプラスミドp F 3 S H 9 2 と命名した。このプラスミドで形質転換された大腸菌J M 1 0 9、Escherichia coli J M 1 0 9 / p F 3 S H 9 2 についてF 3 の発現を調べたところ、F 3 に相当する分子量のタンパク質が発現していることが確認された。

(2) F 3 遺伝子を含むDNA断片の塩基配列の決定

上記プラスミドp F 3 S H 9 2 の挿入DNA断片の塩基配列をジデオキシ法によって決定した。得られた塩基配列を解析した結果、そこにコードされるタンパク質のN末端アミノ酸配列がF 3 のものと一致するオープンリーディングフレームが見い出された。このオープンリーディングフレームの塩基配列を配列表の配列番号：79に、また、該塩基配列から推定されるF 3 のアミノ酸配列を配列表の配列番号：80にそれぞれ示す。このアミノ酸配列について、既知のタンパク質のアミノ酸配列とのホモロジーを検索したところ、マイコプラズマ ラモサ (Mycoplasma ramosa) 由来のアセチルポリアミンアミノヒドラーゼ [ジャーナル オブ バクテリオロジー (Journal of Bacteriology)、第178巻、第5781～5786頁(1996)]、及びヒトのヒストンデアセチラーゼ [サイエンス (Science)、第272巻、第408～411頁(1996)] との間に相同性が見られた。

実施例 14

以下の実施例において、市販の酵素の活性は各酵素の表示に基づいて示した。また、市販の酵素を含む反応液の調製は、特に断らない限り各酵素の説明書にしたがうか、あるいは添付されている反応用緩衝液を使用して調製した。PCRは

ジーンアンプ PCRシステム 9600 (GeneAmp PCR System 9600、パーキナーエルマー社製) を使用して実施した。

(1) 抗PFU-RFC抗体の調製

実施例 9 (6) の PFU-RFC 標品を $1\text{ mg}/100\text{ }\mu\text{l}$ となるよう 50 mM トリス-塩酸、 $\text{pH } 8.0$ 、 2 mM 2-メルカプトエタノール、 75 mM NaCl で希釈し、これに当量の完全フロイント・アジュバントを加えて乳化させた。これを 1 回につき $50\text{ }\mu\text{l}$ ずつ、3 週間おきに 4 回ウサギ皮下に注射した。最終免疫より 10 日後に全血を採取し、これを室温に 60 分間放置した後、遠心分離して抗 PFU-RFC ポリクローナル抗体を含む抗血清 50 ml を得た。この抗血清 20 ml に 20 ml の飽和硫酸アンモニウム溶液を添加し、 4°C で 45 分間、ゆるやかに攪拌後遠心した。得られた沈殿を 5 ml の 20 mM リン酸ナトリウムバッファー $\text{pH } 7.0$ に懸濁し、同じバッファー 2 リットルを外液として 2 時間の透析を 3 回行った。透析後の溶液 14 ml を 20 mM リン酸ナトリウムバッファー ($\text{pH } 7.0$) で平衡化したプロテイン A カラム (ファルマシア社製) に供し、同バッファーで洗浄後、 0.1 M クエン酸ナトリウムバッファー ($\text{pH } 3.0$) で溶出した。溶出した抗 PFU-RFC 抗体を 1 M トリス-塩酸、 $\text{pH } 9.0$ で中和後、セントリフロー CF-50 で濃縮し、PD-10 カラム (ファルマシア社製) でカップリングバッファー (0.5 M 塩化ナトリウム、 0.2 M 重炭酸ナトリウム、 $\text{pH } 8.3$) に置換して抗 PFU-RFC 抗体を含む溶液を調製した。

(2) 抗PFU-RFC抗体カラムの作製

HiTrap NHS-activated カラム (ファルマシア社製) を 1 mM 塩酸 6 ml で洗浄後、上記の抗 PFU-RFC ポリクローナル抗体溶液 0.95 ml (3.8 mg 相当の抗 PFU-RFC 抗体を含む) をアプライした。以降

実施例 2 (3) と同様の方法により、抗 PFU-RFC 抗体カラムを調製した。

(3) 抗 PFU-RFC 抗体カラムを用いた PFU-RFC を含む複合体の精製
ピロコッカス・フリオサス DSM 3638 を実施例 1 記載の方法と同様に培養し、培養液 10 リットル分の菌体を得た。この菌体を 33 ml の 2 mM PMSF を含むバッファー C (50 mM トリス-塩酸、pH 8.0、1 mM ATP) に懸濁し、超音波破碎機にかけた。破碎液を 12000 rpm、10 分間、遠心して得られた上清 38 ml を 0.1 M NaCl を含むバッファー C で平衡化した抗 PFU-RFC 抗体カラムに供した。カラムを 0.1 M NaCl を含むバッファー C で洗浄後、85℃で 1 時間加熱し、0.1 M NaCl を含むバッファー C で PFU-RFC 複合体を溶出した。この溶出液を SDS-PAGE (12.5% ポリアクリルアミドゲル、泳動緩衝液として 25 mM トリス-塩酸、192 mM グリシン、0.1% SDS、pH 8.4 を使用) に供し、泳動後のゲルを常法に従いクマシーブリリアントブルー-R-250 で染色した結果、PFU-RFC のバンド以外に上記 F7 に相当する 33 キロダルトンの位置に 1 本と 60 キロダルトン付近に 2 本のバンドが検出された。

そこで、これら 3 本のバンドに存在するタンパク質の N 末端アミノ酸配列を実施例 3 (2) と同様の方法で分析したところ、図 14 に示すように上記 F7 に相当する位置のタンパク質の N 末端アミノ酸配列は F7 と、60 キロダルトン付近の 2 種類のタンパク質の N 末端アミノ酸配列はいずれも上記 PFU-RFCLS の N 末端アミノ酸配列と一致した。

次に、この溶出液に含まれる PFU-RFC、PFU-RFCLS、F7 のタンパク質量をこれらのタンパク質に結合するクマシーブリリアントブルーの量により定量した。溶出液を SDS-PAGE (12.5% ポリアクリルアミドゲル、泳動緩衝液として 25 mM トリス-塩酸、192 mM グリシン、0.1% SDS、pH 8.4 を使用) に供し、泳動後のゲルを常法に従いクマシーブ

リリアントブルー-R-250で染色した後、バンドを切り出し500 μ lの70%ギ酸でクマシーブリリアントブルーを抽出し630nmにおける吸光度を測定した。濃度既知の実施例8(4)のF7標品及び実施例9(6)のPFU-RFC標品を用いて作成した検量線に基づき、溶出液500 μ l中に208 μ gのPFU-RFC、55 μ gのPFU-RFCLS、51 μ gのF7タンパク質が含まれることがわかった。上記のように、PFU-RFC、PFU-RFCLS及びF7の3つのタンパク質で構成された複合体を、以下、RFC-N複合体という。

(4) プライマー伸長反応に及ぼすRFC-N複合体の効果

実施例14(3)で得られたRFC-N複合体の各種ポリメラーゼへのプライマー伸長反応に及ぼす効果を調べるために、PfuポリメラーゼC、Pfu DNAポリメラーゼ(α 型DNAポリメラーゼ、ストラタジーン社製)の活性をRFC-N複合体を添加した場合とその構成成分であるF7のみを添加した場合について比較した。DNAポリメラーゼ活性の測定は、PfuポリメラーゼC又はPfu DNAポリメラーゼを50fmol使用したことを除き、実施例8(5)に記載の方法と同様に行なった。DNAポリメラーゼ活性の測定は実施例8(5)に示したようにM13ファージ一本鎖DNA(M13mp18ssDNA、宝酒造社製)に45塩基の合成オリゴヌクレオチドであるHTプライマーをアニーリングさせたもの(M13-HTプライマー)を使用した。配列表の配列番号:42にHTプライマーの塩基配列を示す。Pfu DNAポリメラーゼでの結果を図15に示した。F7及びRFC-N複合体の添加量は、反応液中に含まれるF7、RFC-N複合体のモル数で表した。図15に示すようにPfu DNAポリメラーゼに対して、RFC-N複合体はF7単独に比べ高い活性の上昇を示した。

さらにプライマー伸長活性について実施例8(5)記載の方法で検討を行った

。測定用反応液は、下記の組成で調製した：①100 fmolのF7、②0.05 μ lのRFC-N複合体（60 fmolのF7含有）、③10 fmolのPfuポリメラーゼC、④10 fmolのPfuポリメラーゼC+100 fmolのF7、⑤10 fmolのPfuポリメラーゼC+0.05 μ lのRFC-N複合体、⑥20 fmolのF7、⑦0.02 μ lのRFC-N複合体（24 fmolのF7含有）、⑧10 fmolのPfu DNAポリメラーゼ、⑨10 fmolのPfu DNAポリメラーゼ+20 fmolのF7、⑩10 fmolのPfu DNAポリメラーゼ+0.02 μ lのRFC-N複合体。それぞれの測定用反応液1 μ lに0.01 μ g/ μ lの 32 P標識M13-HTプライマーを含む9 μ lの反応液（20 mM トリス-塩酸（pH 9.0）、15 mM塩化マグネシウム、2 mM 2-メルカプトエタノール、それぞれ40 μ MのdATP、dGTP、dCTP及びdTTP）を添加し、75℃で2.5分間反応させた。反応終了後、反応液を氷冷して反応を停止し、さらに1 μ lの200 mM EDTA、5 μ lの反応停止液（95%ホルムアミド、20 mM EDTA、0.05%プロモフェノールブルー、0.05%キシレンシアノール）を加えて95℃、5分間の熱変性処理を行った。この反応液のうち1.6 μ lを8 M尿素を含む6%ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動した後、オートラジオグラムを作製した。

次に、より長鎖のプライマー伸長反応物を解析するために実施例8（5）記載の方法で解析した。上記の①～⑩の試料液各1 μ lに終濃度0.01 μ g/ μ lのM13-HTプライマーを含む9 μ lの反応液（20 mM トリス-塩酸、pH 9.0、15 mM塩化マグネシウム、2 mM 2-メルカプトエタノール、それぞれ40 μ MのdATP、dGTP、dCTP及びdTTP、84 nM [α - 32 P]-dCTP）を添加し、75℃で2.5分間反応させた。反応終了後、氷冷した反応液に1.11 μ lの200 mM EDTA、1.23 μ lの500 mM NaOH、2.47 μ lの6倍濃度ローディングバッファー（0.125%プロモフェノールブルー、0.125%キシレンシアノール、9%グ

リセロール)を順次添加し、そのうち6 μ l を0.5% アルカリアガロースゲルを用いて電気泳動した後、オートラジオグラムを作製した。

PfuポリメラーゼC及びPfu DNAポリメラーゼのいずれにおいてもF7単独に比べRFC-N複合体添加時の長鎖の伸長産物の量が増加していた。

なお、長鎖伸長産物の鎖長についてはいずれのポリメラーゼでもF7単独とRFC-N複合体で鑄型全長の約7.2 kbまで認められた。

実施例15 rRFC-M発現用プラスミドの構築

(1) PFU-RFCLSとPFU-RFCとを同時に発現させるプラスミドを構築した。実施例11(2)で得られた塩基配列を参考に配列表の配列番号:81に塩基配列を示すプライマーRFLS-NdeI及び配列番号:82に塩基配列を示すRFLS-S9を合成した。この両プライマーを使用し、上記のプラスミドpRFLSNhを鑄型にPCRを行った。PCRは酵素としてPfu DNAポリメラーゼを用い、実施例5(1)と同じ組成の反応液で、10ngのプラスミドpRFLSNhと20 pmolずつのプライマーを添加し、94°C(30秒)~55°C(30秒)~72°C(3分)を1サイクルとする30サイクルの反応を行った。PCRで得られた増幅DNA断片をNdeIとPstIで消化して単離された約920bpのNdeI-PstI断片と、実施例11(2)で得られたプラスミドpRFLSNhから単離された約600bpのPstI-EcoRI断片、実施例9(4)で得られたプラスミドpRFS254SNcから単離された約2kbのEcoRI-BamHI断片とを混合してプラスミドベクターpTV119NdのNdeI-BamHIサイト間にサブクローニングした。こうして得られた組換えプラスミドをpRFC10と命名した、また、該プラスミドで形質転換された大腸菌JM109を *Escherichia coli* JM109 / pRFC10 と命名した。前記形質転換体はPFU-RFCLS及びPFU-RFCを高発現することが判明した。

(2) PFU-RFCLS及びPFU-RFCをコードする遺伝子の塩基配列の決定

実施例15(1)で得られた、プラスミドpRFC10中の挿入DNA断片のうち、PCRで増幅した領域はジデオキシ法で塩基配列を確認し、PCRに起因する変異のないことを確認した。この結果と実施例9(3)及び実施例11(2)の結果からPFU-RFCLS及び介在配列を含まないPFU-RFCをコードする遺伝子の塩基配列を決定した。こうして得られたPFU-RFCLS及び介在配列を含まないPFU-RFCをコードする遺伝子について塩基配列を配列表の配列番号: 83に、またその制限酵素地図を図16に示す。

実施例16 rRFC-M標品の調製

実施例15(1)で得られた*Escherichia coli* JM109 / pRFC10をアンピシリンが100 µg/ml、IPTGが1 mMの濃度で存在するLB培地(トリプトン10 g/l、酵母エキス5 g/l、塩化ナトリウム5 g/l、pH 7.2) 500 ml × 4で16時間培養を行なった。集菌後、菌体を35.9 mlのソニケーションバッファー(50 mM トリス-HCl, pH 8.0、2 mM 2-メルカプトエタノール、10%グリセロール、2 mM PMSF(フェニルメタンスルフォニルフルオライド))に懸濁し、超音波破碎機にかけた。12000 rpm、10分の遠心分離後、80°C、15分間の熱処理を行なった。その後再度12000 rpm、10分の遠心分離を行なって33.0 mlの熱処理酵素液を得た。次にこの溶液をバッファーA(50 mM トリス-HCl, pH 8.0、2 mM 2-メルカプトエタノール、10%グリセロール)で平衡化したRESOURCE Qカラム(ファルマシア社製)に供し、FPLCシステム(ファルマシア社製)を用いてクロマトグラフィーを行なった。溶出は、0~500 mMの塩化ナトリウム直線濃度勾配により行なった。

溶出液をSDS-PAGE (12.5%ポリアクリルアミドゲル、泳動緩衝液として25mMトリス-塩酸、192mMグリシン、0.1%SDS、pH8.4を使用した)により分析した結果、PFU-RFCLS及びPFU-RFCはともに240mM塩化ナトリウムの濃度で溶出されていた。実施例9(6)に記載のようにPFU-RFC単独で発現させた菌体から得られた溶出液をRESOURCE Qカラムに供した場合には、前記RESOURCE Qカラムには吸着されなかったが、PFU-RFCLSとPFU-RFCを同時に発現させた菌体から得られた溶出液をRESOURCE Qカラムに供すると吸着され、上記のように240mM塩化ナトリウムの濃度でPFU-RFCLSとPFU-RFCが同時に溶出された。この結果より、これらの両タンパク質が複合体を形成していることを示している。以下、この複合体をrRFC-M複合体という。

rRFC-M複合体画分を集めて得られた4.8mlの酵素溶液をセントリフローCF50を用いて濃縮後、PD-10カラム(ファルマシア社製)で150mM塩化ナトリウムを含むバッファーAに置換し、3.5mlの溶液を150mM塩化ナトリウムを含むバッファーAで平衡化したヘパリンカラム(ファルマシア社製)に供した。FPLCシステムを用いて150mM→650mM塩化ナトリウム直線濃度勾配により展開し、450mM塩化ナトリウムのところに溶出されたrRFC-M複合体画分を得た。この画分3.9mlをセントリコナー10(アミコン社製)を用いて濃縮し、115 μ lの濃縮液を50mMトリス-HCl, pH8.0, 2mM 2-メルカプトエタノール、75mM塩化ナトリウムで平衡化したSuperdex 200ゲルろ過カラム(ファルマシア社製)に供した。同じバッファーで溶出を行なった結果、rRFC-M複合体のリテンションタイムは、26.3分であった。同一条件での分子量マーカーの溶出位置との比較結果よりrRFC-M複合体は、約370キロダルトンと算出された。

さらにrRFC-M複合体中の各ユニットの構成比を求めるために、前記約370kDaの分子量の溶出画分をSDS-PAGEに供した。

泳動後のゲルを常法に従いクマシーブリリアントブルーR-250染色後、PFU-RFCLS及びPFU-RFCのタンパク質のバンドを切り出し、500 μ lの70%ギ酸で抽出した。各抽出液の630nmの吸収を測定し、その結果を実施例9(6)で調製したPFU-RFCを用いて作製した検量線と比較することにより、それぞれのタンパク質量を求めモル数を計算した。

その結果、PFU-RFCLSとPFU-RFCは、1:4の割合で存在していた。上記に示したゲルより算出されたrRFC-M複合体の分子量は、約370kDaであることに基づき、rRFC-M複合体は、2分子のPFU-RFCLSと8分子のPFU-RFCにより形成されていると考えられた。そこで、前記rRFC-M複合体を1単位としてモル数を算出した。

実施例17 F3発現用プラスミドの構築

(1) 実施例13で作製したプラスミドpF3SH92を鋳型とし、配列表の配列番号:84に塩基配列を示すプライマーF3Nd及び配列番号:76に塩基配列を示すF3S2プライマーを用いてPCRを行った。PCRは、酵素としてPfu DNAポリメラーゼを用い、実施例5(1)と同じ組成の反応液で、1ngのプラスミドpF3SH92と20pmolずつのプライマーを添加し、94°C(30秒)~55°C(30秒)~72°C(1分)を1サイクルとする30サイクルの反応を行った。PCRで得られた増幅DNA断片をNdeIとPstIで消化して単離された約0.5kbのNdeI-PstI断片と、プラスミドpF3SH92から単離された約1.1kbのPstI-EcoRI断片とを混合してプラスミドベクターpTV119NdのNdeI-EcoRIサイト間にサブクローニングした。こうして得られた組換えプラスミドをpF3-19と命名した。また、該プラスミドで形質転換された大腸菌JM109を *Escherichia coli* JM109 / pF3-19 と命名した。該形質転換体はF3を高発現することが判明した。

(2) F 3 をコードする遺伝子の塩基配列の決定

実施例 17 (1) で得られた、プラスミド p F 3 - 19 中の挿入 DNA 断片のうち、PCR で増幅した領域はジデオキシ法で塩基配列を確認し、PCR に起因する変異のないことを確認した。

実施例 18 精製 F 3 標品の調製

実施例 17 (1) で得られた *Escherichia coli* JM109 /pF3-19 をアンピシリンが $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で存在する LB 培地 (トリプトン $10 \text{ g}/\text{リットル}$ 、酵母エキス $5 \text{ g}/\text{リットル}$ 、NaCl $5 \text{ g}/\text{リットル}$ 、pH 7.2) $500 \text{ ml} \times 4$ で 16 時間培養を行った。集菌後、菌体を 50 ml のソニケーションバッファー (50 mM トリス-塩酸、pH 8.0、2 mM 2-メルカプトエタノール、10% グリセロール、2 mM PMSF (フェニルメタンスルフォニルフルオリド)) に懸濁し、超音波破碎機にかけた。12000 rpm、10 分の遠心分離後、上清を 80°C 、15 分間の熱処理にかけた。その後再度 12000 rpm、10 分の遠心分離を行なって得られた 44 ml の熱処理上清を実施例 16 記載のバッファー A で平衡化した RESOURCE Q カラム (ファルマシア社製) に供し、FPLC システム (ファルマシア社製) を用いてクロマトグラフィーを行った。展開は $0 \rightarrow 500 \text{ mM}$ の NaCl 直線濃度勾配により行った。 140 mM から 240 mM NaCl のところで溶出された F 3 を含む画分 11 ml の溶液に 3 M の硫酸アンモニウムを含むバッファー A を 5.5 ml 加え 1 M の硫酸アンモニウムを含むバッファー A で平衡化した Hi Trap butyl カラム (ファルマシア社製) に供した。FPLC システムを用いて 1 M の硫酸アンモニウムを含むバッファー A でカラムを洗浄後、 0.5 M 硫酸アンモニウムを含むバッファー A で F 3 を溶出した。この画分 6 ml を 0.5 M 硫酸アンモニウムを含むバッファー A で平衡化した Hi Trap phenyl カラム (ファルマシア社製) に供した。FPLC システムを用いて 0.5 M 硫酸アンモニウムを含むバッファー A でカラムを洗

浄後、バッファーAでF3を溶出した。この画分9.5mlをセントリコン-10（アミコン社製）を用いて濃縮し、155 μ lの濃縮液を50mMトリス-塩酸、pH8.0、2mM 2-メルカプトエタノール、75mM NaClで平衡化した Superdex 200ゲル濾過カラム（ファルマシア社製）に供した。同じバッファーで溶出を行った結果、F3はリテンションタイム42.1分の位置に溶出された。同一条件での分子量マーカーの溶出位置との比較の結果より、分子量約25キロダルトンと予想された。F3の分子量の理論値は37キロダルトンであることに基づいて、F3は単量体であると推定される。

実施例19 精製F5標品の調製

実施例12(4)で得られたプラスミド pF5NBPETで形質転換された大腸菌HMS174(DE3)、Escherichia coli HMS174(DE3) /pF5NBPETをアンピシリンが100 μ g/mlの濃度で存在するLB培地（トリプトン10g/リットル、酵母エキス5g/リットル、NaCl 5g/リットル、pH7.2）500ml \times 4で16時間培養を行った。集菌後、菌体を61mlのソニケーションバッファーに懸濁し、超音波破碎機を用いて破碎した。破碎後の菌体を12000rpm、10分の遠心分離後、上清を80 $^{\circ}$ C、15分間の熱処理にかけた。その後再度12000rpm、10分の遠心分離を行って得られた60.5mlの熱処理上清に8.71gの硫酸アンモニウムを添加し、4 $^{\circ}$ Cで2時間攪拌した後12000rpm、10分の遠心分離を行った。沈殿物を19mlのバッファーAで溶解しバッファーAで透析した。透析後の酵素液をバッファーAで平衡化した RESOURCE Qカラム（ファルマシア社製）に供し、FPLCシステム（ファルマシア社製）を用いてクロマトグラフィーを行った。展開は0 \rightarrow 500mMのNaCl直線濃度勾配により行った。350mMから450mM NaClのところ溶出されたF5を含む画分11mlの溶液をセントリコン-10（アミコン社製）を用いて濃縮し、222 μ lの濃縮液を50mMトリス-塩酸、pH8.0、2mM 2

ーメルカプトエタノール、7.5 mM NaClで平衡化した Superdex 200ゲル濾過カラム（ファルマシア社製）に供した。同じバッファーで溶出を行った結果、F 5はリテンションタイム32.5分の位置に溶出された。同一条件での分子量マーカの溶出位置との比較の結果より、分子量約14.5キロダルトンと予想された。この分子量はF 5が7量体を形成した場合に相当する。

実施例20 プライマーの作製

λ DNAの塩基配列をもとに λ 1B～ λ 5、 λ 7～ λ 9の8種類のプライマーを合成した。プライマー λ 1B～ λ 5、 λ 7～ λ 9の塩基配列をそれぞれ配列表の配列番号：85～92に示す。これらのプライマーの組み合わせによって λ DNAを鋳型としたPCRで増幅される増幅DNA断片の鎖長を表4に示す。

表 4

プライマー対		増幅DNA断片の鎖長	
λ 1B／	λ 2	0.5	kb
λ 1B／	λ 3	1	kb
λ 1B／	λ 4	2	kb
λ 1B／	λ 5	4	kb
λ 1B／	λ 7	8	kb
λ 1B／	λ 8	10	kb
λ 1B／	λ 9	12	kb

実施例21 DNAポリメラーゼに対するF 1タンパク質の効果

実施例5で得られたF 1タンパク質についてPCRへの効果を調べた。 λ DNAを鋳型とした1～4 kbのDNA断片の増幅反応を行なうために、プライマー対としてプライマー λ 1B及び λ 3、プライマー λ 1B及び λ 4、プライマー λ 1B及び λ 5のそれぞれを使用し、以下に示す組成の反応液を調製した：10 mMト

リス-塩酸、pH 9.2、75 mM 塩化カリウム、6 mM 塩化マグネシウム、それぞれ0.4 mMのdATP、dCTP、dGTP及びdTTP、0.01% BSA及び1.25単位のPfuポリメラーゼC、500 pgの鑄型DNA、5 pmolずつの各プライマー、173 pmolのF1タンパク質（最終容量は25 μ l）。各反応液について98°C、0秒～68°C、0秒を1サイクルとした30サイクルの反応を行った。なお、本明細書においては、「98°C、0秒」、「68°C、0秒」等の記載は、温度が設定された温度に達したと同時に次の設定温度への以降が起こるように反応装置をプログラムしたことを示す。

反応終了後、反応液5 μ lを1%アガロースゲル（宝酒造社製）にて電気泳動し、増幅断片を確認した。

その結果、使用したプライマー対に応じて1 kb、2 kb、4 kbのDNA断片が増幅されていることが確認された。一方、上記反応液のF1タンパク質を添加していないものを上記反応条件でPCRしたところいずれの増幅断片も確認できなかった。

実施例22 DNAポリメラーゼに対するF1、F3、F5タンパク質の効果

実施例5で得られたF1タンパク質、実施例18で得られたF3タンパク質、実施例19で得られたF5タンパク質を用い、PCRによる λ DNAを鑄型とした6 kbのDNA断片の増幅への効果について検討した。プライマー対としてプライマー λ 1及び λ 6を使用した他は、実施例21と同じ組成の反応液を調製した。なお、F1タンパク質は173 pmol、F3タンパク質は10 pmol、F5タンパク質は1 pmolをそれぞれ反応液に添加し最終容量は25 μ lとした。各反応液について98°C、1秒～68°C、2分を1サイクルとした30サイクルの反応を行った。反応終了後、反応液5 μ lを1%アガロースゲルにて電気泳動し、増幅断片を確認した。

その結果、F1、F3、F5タンパク質の各存在下いずれにおいても6 Kbの増

増幅断片が確認された。一方、これらのタンパク質を添加しない場合には、増幅断片は確認できなかった。

実施例 23 DNAポリメラーゼに対する F2、F4 タンパク質の効果

実施例 6 で得られた F2 タンパク質、実施例 7 で得られた F4 タンパク質を用い、PCR による λ DNA を鋳型とした 4 kb の DNA 断片の増幅反応への効果について検討した。プライマー対としてプライマー λ 1 B 及び λ 5、0.75 単位の Pfu ポリメラーゼ C、1 ng の鋳型 λ DNA を使用した他は実施例 21 と同じ組成の反応液を調製した。なお、F2 タンパク質、F4 タンパク質は、それぞれ 1.095 pmol を反応液に添加し最終容量を 25 μ l にした。各反応液について 94°C、30 秒～55°C、30 秒～72°C、2 分を 1 サイクルとした 25 サイクルの反応を行った。反応終了後、反応液 5 μ l を 1% アガロースゲルにて電気泳動し、増幅断片を確認した。

その結果、F2、F4 タンパク質の各存在下いずれにおいても 4 Kb の増幅断片が確認された。一方、これらのタンパク質を添加しない場合には、増幅断片は確認できなかった。

実施例 24 DNAポリメラーゼに対する rRFC-M 複合体の効果

rRFC-M 複合体の各種ポリメラーゼへのプライマー伸長反応に及ぼす効果を調べるために、Pfu ポリメラーゼ C、Pfu DNA ポリメラーゼ (α 型 DNA ポリメラーゼ、ストラタジーン社製) の活性を rRFC-M 複合体と F7 共存下の場合と、F7 のみ存在の場合について比較した。

DNA ポリメラーゼ活性の測定は、50 fmol の Pfu ポリメラーゼ C 又は Pfu DNA ポリメラーゼを使用し、400 fmol の rRFC-M 複合体及び 0～200 fmol の F7 を添加したことを除き、実施例 8 (5) に記載の方法と同様に行なった。Pfu DNA ポリメラーゼを用いた場合の結果を図 17

に示した。Pfu DNAポリメラーゼに対する効果として、rRFC-M複合体とF7共存下の方が、F7単独に比べて高い活性の上昇を示した。また、PfuポリメラーゼCに対する効果もPfu DNAポリメラーゼの場合と同じ傾向であった。

実施例 25 PCRにおけるrRFC-M複合体とF7タンパク質共存の効果

λDNAを鋳型とした4 kbのDNA断片の増幅反応を実施するため、プライマーλ1 B及びλ5を使用し、0.375単位のPfuポリメラーゼCを使用した他は実施例21と同じ組成の反応液を調製した。なお、rRFC-M複合体は312.5 fmol、F7タンパク質は125 fmolを反応液にそれぞれ添加し、最終容量は25 μlとした。各反応液について98℃、0秒～68℃、10秒を1サイクルとした30サイクルの反応を行った。反応終了後、反応液5 μlを1%アガロースゲル（宝酒造社製）にて電気泳動し、増幅断片を確認した。

その結果、rRFC-M複合体とF7タンパク質の共存した系は、使用したプライマー対に応じて4 kbのDNA断片が増幅されていることが確認された。一方、これらのタンパク質を添加しない場合には、増幅断片は確認できなかった。

さらにλDNAを鋳型とした8～12 kbのDNA断片の増幅反応について同様の実験を行なった。プライマー対としてプライマーλ1 B及びλ7、プライマーλ1 B及びλ8、プライマーλ1 B及びλ9のそれぞれを使用し、さらに0.375単位のPfuポリメラーゼC、2.5 ngの鋳型λDNAを使用した他は、実施例21と同じ組成で調製した。なお、rRFC-M複合体は312.5 fmol、F7タンパク質は125 fmolを反応液にそれぞれ添加し、最終容量は25 μlとした。各反応液について98℃、0秒～68℃、3分を1サイクルとした30サイクルの反応を行った。反応終了後、反応液5 μlを1%アガロースゲル（宝酒造社製）にて電気泳動し、増幅断片を確認した。

その結果、rRFC-M複合体とF7タンパク質の共存した系は、使用したプ

ライマー対に応じて8 kb、10 kb、12 kbのDNA断片が増幅されていることが確認された。一方、なにも添加していない系においては、8 kbのDNA断片のみ確認できた。

実施例26 Pfu DNAポリメラーゼに対するrRFC-M複合体とF7タンパク質共存の効果

λDNAを鋳型とした4 kbのDNA断片の増幅反応を実施するため、プライマー対としてプライマーλ1B及びλ3、プライマーλ1B及びλ4、プライマーλ1B及びλ5のそれぞれを使用し、以下に示す組成の反応液を調製した：Pfu DNAポリメラーゼ添付バッファー、0.2 mM dATP、dCTP、dGTP、dTTP及び各0.5単位のPfuポリメラーゼ、500 pgの鋳型DNA、2.5 pmolずつの各プライマー、2.5 pmolのrRFC-M複合体タンパク質及び0.5 pmolのF7タンパク質（最終容量は25 μl）。各反応液について94℃、30秒～55℃、30秒～72℃、1分を1サイクルとした25サイクルの反応を行った。反応終了後、反応液5 μlを1%アガロースゲルにて電気泳動し、増幅断片を確認した。

その結果、rRFC-M複合体とF7タンパク質の共存した系は、使用したプライマー対に応じて1 kb、2 kb、4 kbのDNA断片が増幅されていることが確認された。一方、これらのタンパク質を添加しない場合には、1 kb～2 kbのDNA断片のみが確認できた。

実施例27 混合型DNAポリメラーゼに対するrRFC-M複合体とF7タンパク質共存の効果

2種のDNAポリメラーゼを混合して使用するPCRについてrRFC-M複合体とF7タンパク質共存の効果を調べた。

λDNAを鋳型とした1 kbのDNA断片の増幅反応について実施するため、プラ

イマー対としてプライマー λ 1 B及び λ 3を使用し、以下に示す組成の反応液を調製した：タカラLAタック用添付バッファー（Mgプラス）、それぞれ0.4 mM dATP、dCTP、dGTP及びdTTP、1.25 単位のLAタックDNAポリメラーゼ（宝酒造社製）、500 pgの鑄型DNA、5 pmolずつの各プライマー、62.5 fmolのRFC複合体タンパク質及び12.5 fmolのF7タンパク質（最終容量は25 μ l）。各反応液について98℃、0秒～68℃、10秒を1サイクルとした30サイクルの反応を行った。反応終了後、反応液5 μ lを1%アガロースゲルにて電気泳動し、増幅断片を確認した。

その結果、rRFC-M複合体とF7タンパク質を添加した系と上記反応液にrRFC-M複合体のみ添加した系、F7タンパク質のみ添加した系、LAタックDNAポリメラーゼのみの系を比較したところでは、rRFC-M複合体とF7タンパク質を添加した系が最も効率よく1 kbのDNA断片を増幅することが確認できた。

産業上の利用可能性

本発明により、DNAポリメラーゼの有するDNA合成活性を高めるDNAポリメラーゼ関連因子が提供される。該因子は各種のDNAポリメラーゼに対して作用を示し、また、DNAポリメラーゼが使用される各種の工程に利用することが可能であり、遺伝子工学研究用試薬として有用である。さらに、本発明のDNAポリメラーゼ関連因子をコードする遺伝子を用いた遺伝子工学的な該酵素の製造も可能となった。

配列表

配列番号 : 1

配列の長さ : 249

配列の型 : アミノ酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列 :

Met Pro Phe Glu Ile Val Phe Glu Gly Ala Lys Glu Phe Ala Gln		
	5	10 15
Leu Ile Asp Thr Ala Ser Lys Leu Ile Asp Glu Ala Ala Phe Lys		
	20	25 30
Val Thr Glu Asp Gly Ile Ser Met Arg Ala Met Asp Pro Ser Arg		
	35	40 45
Val Val Leu Ile Asp Leu Asn Leu Pro Ser Ser Ile Phe Ser Lys		
	50	55 60
Tyr Glu Val Val Glu Pro Glu Thr Ile Gly Val Asn Met Asp His		
	65	70 75
Leu Lys Lys Ile Leu Lys Arg Gly Lys Ala Lys Asp Thr Leu Ile		
	80	85 90
Leu Lys Lys Gly Glu Glu Asn Phe Leu Glu Ile Thr Ile Gln Gly		
	95	100 105
Thr Ala Thr Arg Thr Phe Arg Val Pro Leu Ile Asp Val Glu Glu		
	110	115 120
Met Glu Val Asp Leu Pro Glu Leu Pro Phe Thr Ala Lys Val Val		
	125	130 135

Val Leu Gly Glu Val Leu Lys Asp Ala Val Lys Asp Ala Ser Leu			
	140	145	150
Val Ser Asp Ser Ile Lys Phe Ile Ala Arg Glu Asn Glu Phe Ile			
	155	160	165
Met Lys Ala Glu Gly Glu Thr Gln Glu Val Glu Ile Lys Leu Thr			
	170	175	180
Leu Glu Asp Glu Gly Leu Leu Asp Ile Glu Val Gln Glu Glu Thr			
	185	190	195
Lys Ser Ala Tyr Gly Val Ser Tyr Leu Ser Asp Met Val Lys Gly			
	200	205	210
Leu Gly Lys Ala Asp Glu Val Thr Ile Lys Phe Gly Asn Glu Met			
	215	220	225
Pro Met Gln Met Glu Tyr Tyr Ile Arg Asp Glu Gly Arg Leu Thr			
	230	235	240
Phe Leu Leu Ala Pro Arg Val Glu Glu			
	245		

配列番号 : 2

配列の長さ : 7 5 0

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : Genomic DNA

配列 :

ATGCCATTTG AAATCGTATT TGAAGGTGCA AAAGAGTTTG CCCAACTTAT AGACACCGCA 60

AGTAAGTTAA TAGATGAGGC CGCGTTTAAA GTTACAGAAG ATGGGATAAG CATGAGGGCC 120

```

ATGGATCCAA GTAGAGTTGT CCTGATTGAC CTAAATCTCC CGTCAAGCAT ATTTAGCAAA 180
TATGAAGTTG TTGAACCAGA AACAATTGGA GTTAACATGG ACCACCTAAA GAAGATCCTA 240
AAGAGAGGTA AAGCAAAGGA CACCTTAATA CTCAAGAAAG GAGAGGAAAA CTTCTTAGAG 300
ATAACAATTC AAGGAACTGC AACAAGAACA TTTAGAGTTC CCCTAATAGA TGTAGAAGAG 360
ATGGAAGTTG ACCTCCCAGA ACTTCCATTC ACTGCAAAGG TTGTAGTTCT TGGAGAAGTC 420
CTAAAAGATG CTGTTAAAGA TGCCTCTCTA GTGAGTGACA GCATAAAATT TATTGCCAGG 480
GAAAATGAAT TTATAATGAA GGCAGAGGGA GAAACCCAGG AAGTTGAGAT AAAGCTAACT 540
CTTGAAGATG AGGGATTATT GGACATCGAG GTTCAAGAGG AGACAAAGAG CGCATATGGA 600
GTCAGCTATC TCTCCGACAT GGTAAAGGA CTTGGAAAGG CCGATGAAGT TACAATAAAG 660
TTTGGAAATG AAATGCCCAT GCAAATGGAG TATTACATTA GAGATGAAGG AAGACTTACA 720
TTCCTACTGG CTCCAAGAGT TGAAGAGTGA 750

```

配列番号 : 3

配列の長さ : 3 2 7

配列の型 : アミノ酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列 :

```

Met Ser Glu Glu Ile Arg Glu Val Lys Val Leu Glu Lys Pro Trp
          5              10              15
Val Glu Lys Tyr Arg Pro Gln Arg Leu Asp Asp Ile Val Gly Gln
          20              25              30
Glu His Ile Val Lys Arg Leu Lys His Tyr Val Lys Thr Gly Ser
          35              40              45
Met Pro His Leu Leu Phe Ala Gly Pro Pro Gly Val Gly Lys Thr

```

50	55	60
Thr Ala Ala Leu Ala Leu Ala Arg Glu Leu Phe Gly Glu Asn Trp		
65	70	75
Arg His Asn Phe Leu Glu Leu Asn Ala Ser Asp Glu Arg Gly Ile		
80	85	90
Asn Val Ile Arg Glu Lys Val Lys Glu Phe Ala Arg Thr Lys Pro		
95	100	105
Ile Gly Gly Ala Ser Phe Lys Ile Ile Phe Leu Asp Glu Ala Asp		
110	115	120
Ala Leu Thr Gln Asp Ala Gln Gln Ala Leu Arg Arg Thr Met Glu		
125	130	135
Met Phe Ser Ser Asn Val Arg Phe Ile Leu Ser Cys Asn Tyr Ser		
140	145	150
Ser Lys Ile Ile Glu Pro Ile Gln Ser Arg Cys Ala Ile Phe Arg		
155	160	165
Phe Arg Pro Leu Arg Asp Glu Asp Ile Ala Lys Arg Leu Arg Tyr		
170	175	180
Ile Ala Glu Asn Glu Gly Leu Glu Leu Thr Glu Glu Gly Leu Gln		
185	190	195
Ala Ile Leu Tyr Ile Ala Glu Gly Asp Met Arg Arg Ala Ile Asn		
200	205	210
Ile Leu Gln Ala Ala Ala Ala Leu Asp Lys Lys Ile Thr Asp Glu		
215	220	225
Asn Val Phe Met Val Ala Ser Arg Ala Arg Pro Glu Asp Ile Arg		
230	235	240
Glu Met Met Leu Leu Ala Leu Lys Gly Asn Phe Leu Lys Ala Arg		

245	250	255
Glu Lys Leu Arg Glu Ile Leu Leu Lys Gln Gly Leu Ser Gly Glu		
260	265	270
Asp Val Leu Val Gln Met His Lys Glu Val Phe Asn Leu Pro Ile		
275	280	285
Glu Glu Pro Lys Lys Val Leu Leu Ala Asp Lys Ile Gly Glu Tyr		
290	295	300
Asn Phe Arg Leu Val Glu Gly Ala Asn Glu Ile Ile Gln Leu Glu		
305	310	315
Ala Leu Leu Ala Gln Phe Thr Leu Ile Gly Lys Lys		
320	325	

配列番号 : 4

配列の長さ : 9 8 4

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : Genomic DNA

配列 :

ATGAGCGAAG AGATTAGAGA AGTTAAGGTT CTAGAAAAAC CCTGGGTTGA GAAGTATAGA	60
CCTCAAAGAC TTGACGACAT TGTAGGACAA GAGCACATAG TGAAAAGGCT CAAGCACTAC	120
GTCAAACTG GATCAATGCC CCACCTACTC TTCGCAGGCC CCCCTGGTGT CGGAAAGACT	180
ACAGCGGCTT TGGCCCTTGC AAGAGAGCTT TTCGGCGAAA ACTGGAGGCA TAACTTCCTC	240
GAGTTGAATG CTTCAGATGA AAGAGGTATA AACGTAATTA GAGAGAAAGT TAAGGAGTTT	300
GGGAGAACAA AGCCTATAGG AGGAGCAAGC TTCAAGATAA TTTTCCTTGA TGAGGCCGAC	360
GCTTTAACTC AAGATGCCCA ACAAGCCTTA AGAAGAACCA TGGAAATGTT CTCGAGTAAC	420

GTTCGCTTTA TCTTGAGCTG TAACTACTCC TCCAAGATAA TTGAACCCAT ACAGTCTAGA 480
 TGTGCAATAT TCCGCTTCAG ACCTCTCCGC GATGAGGATA TAGCGAAGAG ACTAAGGTAC 540
 ATTGCCGAAA ATGAGGGCTT AGAGCTAACT GAAGAAGGTC TCCAAGCAAT ACTTTACATA 600
 GCAGAAGGAG ATATGAGAAG AGCAATAAAC ATTCTGCAAG CTGCAGCAGC TCTAGACAAG 660
 AAGATCACCG ACGAAAACGT ATTCATGGTA GCGAGTAGAG CTAGACCTGA AGATATAAGA 720
 GAGATGATGC TTCTTGCTCT CAAAGGCAAC TTCTTGAAGG CCAGAGAAAA GCTTAGGGAG 780
 ATACTTCTCA AGCAAGGACT TAGTGGAGAA GATGTACTAG TTCAGATGCA CAAAGAAGTC 840
 TTCAACCTGC CAATAGAGGA GCCAAAGAAG GTTCTGCTTG CTGATAAGAT AGGAGAGTAT 900
 AACTTCAGAC TCGTTGAAGG GGCTAATGAA ATAATTCAGC TTGAAGCACT CTTAGCACAG 960
 TTCACCCTAA TTGGGAAGAA GTGA 984

配列番号 : 5

配列の長さ : 6 1 3

配列の型 : アミノ酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列 :

Met Asp Glu Phe Val Lys Ser Leu Leu Lys Ala Asn Tyr Leu Ile

5 10 15

Thr Pro Ser Ala Tyr Tyr Leu Leu Arg Glu Tyr Tyr Glu Lys Gly

20 25 30

Glu Phe Ser Ile Val Glu Leu Val Lys Phe Ala Arg Ser Arg Glu

35 40 45

Ser Tyr Ile Ile Thr Asp Ala Leu Ala Thr Glu Phe Leu Lys Val

50 55 60

Lys Gly Leu Glu Pro Ile Leu Pro Val Glu Thr Lys Gly Gly Phe			
	65	70	75
Val Ser Thr Gly Glu Ser Gln Lys Glu Gln Ser Tyr Glu Glu Ser			
	80	85	90
Phe Gly Thr Lys Glu Glu Ile Ser Gln Glu Ile Lys Glu Gly Glu			
	95	100	105
Ser Phe Ile Ser Thr Gly Ser Glu Pro Leu Glu Glu Glu Leu Asn			
	110	115	120
Ser Ile Gly Ile Glu Glu Ile Gly Ala Asn Glu Glu Leu Val Ser			
	125	130	135
Asn Gly Asn Asp Asn Gly Gly Glu Ala Ile Val Phe Asp Lys Tyr			
	140	145	150
Gly Tyr Pro Met Val Tyr Ala Pro Glu Glu Ile Glu Val Glu Glu			
	155	160	165
Lys Glu Tyr Ser Lys Tyr Glu Asp Leu Thr Ile Pro Met Asn Pro			
	170	175	180
Asp Phe Asn Tyr Val Glu Ile Lys Glu Asp Tyr Asp Val Val Phe			
	185	190	195
Asp Val Arg Asn Val Lys Leu Lys Pro Pro Lys Val Lys Asn Gly			
	200	205	210
Asn Gly Lys Glu Gly Glu Ile Ile Val Glu Ala Tyr Ala Ser Leu			
	215	220	225
Phe Arg Ser Arg Leu Lys Lys Leu Arg Lys Ile Leu Arg Glu Asn			
	230	235	240
Pro Glu Leu Asp Asn Val Val Asp Ile Gly Lys Leu Lys Tyr Val			
	245	250	255

Lys Glu Asp Glu Thr Val Thr Ile Ile Gly Leu Val Asn Ser Lys	260	265	270
Arg Glu Val Asn Lys Gly Leu Ile Phe Glu Ile Glu Asp Leu Thr	275	280	285
Gly Lys Val Lys Val Phe Leu Pro Lys Asp Ser Glu Asp Tyr Arg	290	295	300
Glu Ala Phe Lys Val Leu Pro Asp Ala Val Val Ala Phe Lys Gly	305	310	315
Val Tyr Ser Lys Arg Gly Ile Leu Tyr Ala Asn Lys Phe Tyr Leu	320	325	330
Pro Asp Val Pro Leu Tyr Arg Arg Gln Lys Pro Pro Leu Glu Glu	335	340	345
Lys Val Tyr Ala Ile Leu Ile Ser Asp Ile His Val Gly Ser Lys	350	355	360
Glu Phe Cys Glu Asn Ala Phe Ile Lys Phe Leu Glu Trp Leu Asn	365	370	375
Gly Asn Val Glu Thr Lys Glu Glu Glu Glu Ile Val Ser Arg Val	380	385	390
Lys Tyr Leu Ile Ile Ala Gly Asp Val Val Asp Gly Val Gly Val	395	400	405
Tyr Pro Gly Gln Tyr Ala Asp Leu Thr Ile Pro Asp Ile Phe Asp	410	415	420
Gln Tyr Glu Ala Leu Ala Asn Leu Leu Ser His Val Pro Lys His	425	430	435
Ile Thr Met Phe Ile Ala Pro Gly Asn His Asp Ala Ala Arg Gln	440	445	450

Ala Ile Pro Gln Pro Glu Phe Tyr Lys Glu Tyr Ala Lys Pro Ile			
	455	460	465
Tyr Lys Leu Lys Asn Ala Val Ile Ile Ser Asn Pro Ala Val Ile			
	470	475	480
Arg Leu His Gly Arg Asp Phe Leu Ile Ala His Gly Arg Gly Ile			
	485	490	495
Glu Asp Val Val Gly Ser Val Pro Gly Leu Thr His His Lys Pro			
	500	505	510
Gly Leu Pro Met Val Glu Leu Leu Lys Met Arg His Val Ala Pro			
	515	520	525
Met Phe Gly Gly Lys Val Pro Ile Ala Pro Asp Pro Glu Asp Leu			
	530	535	540
Leu Val Ile Glu Glu Val Pro Asp Val Val His Met Gly His Val			
	545	550	555
His Val Tyr Asp Ala Val Val Tyr Arg Gly Val Gln Leu Val Asn			
	560	565	570
Ser Ala Thr Trp Gln Ala Gln Thr Glu Phe Gln Lys Met Val Asn			
	575	580	585
Ile Val Pro Thr Pro Ala Lys Val Pro Val Val Asp Ile Asp Thr			
	590	595	600
Ala Lys Val Val Lys Val Leu Asp Phe Ser Gly Trp Cys			
	605	610	

配列番号 : 6

配列の長さ : 1 2 6 3

配列の型 : アミノ酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列：

Met	Glu	Leu	Pro	Lys	Glu	Ile	Glu	Glu	Tyr	Phe	Glu	Met	Leu	Gln
				5					10					15
Arg	Glu	Ile	Asp	Lys	Ala	Tyr	Glu	Ile	Ala	Lys	Lys	Ala	Arg	Ser
				20					25					30
Gln	Gly	Lys	Asp	Pro	Ser	Thr	Asp	Val	Glu	Ile	Pro	Gln	Ala	Thr
				35					40					45
Asp	Met	Ala	Gly	Arg	Val	Glu	Ser	Leu	Val	Gly	Pro	Pro	Gly	Val
				50					55					60
Ala	Gln	Arg	Ile	Arg	Glu	Leu	Leu	Lys	Glu	Tyr	Asp	Lys	Glu	Ile
				65					70					75
Val	Ala	Leu	Lys	Ile	Val	Asp	Glu	Ile	Ile	Glu	Gly	Lys	Phe	Gly
				80					85					90
Asp	Phe	Gly	Ser	Lys	Glu	Lys	Tyr	Ala	Glu	Gln	Ala	Val	Arg	Thr
				95					100					105
Ala	Leu	Ala	Ile	Leu	Thr	Glu	Gly	Ile	Val	Ser	Ala	Pro	Leu	Glu
				110					115					120
Gly	Ile	Ala	Asp	Val	Lys	Ile	Lys	Arg	Asn	Thr	Trp	Ala	Asp	Asn
				125					130					135
Ser	Glu	Tyr	Leu	Ala	Leu	Tyr	Tyr	Ala	Gly	Pro	Ile	Arg	Ser	Ser
				140					145					150
Gly	Gly	Thr	Ala	Gln	Ala	Leu	Ser	Val	Leu	Val	Gly	Asp	Tyr	Val
				155					160					165

Arg Arg Lys Leu Gly Leu Asp Arg Phe Lys Pro Ser Gly Lys His			
	170	175	180
Ile Glu Arg Met Val Glu Glu Val Asp Leu Tyr His Arg Ala Val			
	185	190	195
Ser Arg Leu Gln Tyr His Pro Ser Pro Asp Glu Val Arg Leu Ala			
	200	205	210
Met Arg Asn Ile Pro Ile Glu Ile Thr Gly Glu Ala Thr Asp Asp			
	215	220	225
Val Glu Val Ser His Arg Asp Val Glu Gly Val Glu Thr Asn Gln			
	230	235	240
Leu Arg Gly Gly Ala Ile Leu Val Leu Ala Glu Gly Val Leu Gln			
	245	250	255
Lys Ala Lys Lys Leu Val Lys Tyr Ile Asp Lys Met Gly Ile Asp			
	260	265	270
Gly Trp Glu Trp Leu Lys Glu Phe Val Glu Ala Lys Glu Lys Gly			
	275	280	285
Glu Glu Ile Glu Glu Ser Glu Ser Lys Ala Glu Glu Ser Lys Val			
	290	295	300
Glu Thr Arg Val Glu Val Glu Lys Gly Phe Tyr Tyr Lys Leu Tyr			
	305	310	315
Glu Lys Phe Arg Ala Glu Ile Ala Pro Ser Glu Lys Tyr Ala Lys			
	320	325	330
Glu Ile Ile Gly Gly Arg Pro Leu Phe Ala Gly Pro Ser Glu Asn			
	335	340	345
Gly Gly Phe Arg Leu Arg Tyr Gly Arg Ser Arg Val Ser Gly Phe			
	350	355	360

Ala Thr Trp Ser Ile Asn Pro Ala Thr Met Val Leu Val Asp Glu			
	365	370	375
Phe Leu Ala Ile Gly Thr Gln Met Lys Thr Glu Arg Pro Gly Lys			
	380	385	390
Gly Ala Val Val Thr Pro Ala Thr Thr Ala Glu Gly Pro Ile Val			
	395	400	405
Lys Leu Lys Asp Gly Ser Val Val Arg Val Asp Asp Tyr Asn Leu			
	410	415	420
Ala Leu Lys Ile Arg Asp Glu Val Glu Glu Ile Leu Tyr Leu Gly			
	425	430	435
Asp Ala Ile Ile Ala Phe Gly Asp Phe Val Glu Asn Asn Gln Thr			
	440	445	450
Leu Leu Pro Ala Asn Tyr Val Glu Glu Trp Trp Ile Gln Glu Phe			
	455	460	465
Val Lys Ala Val Asn Glu Ala Tyr Glu Val Glu Leu Arg Pro Phe			
	470	475	480
Glu Glu Asn Pro Arg Glu Ser Val Glu Glu Ala Ala Glu Tyr Leu			
	485	490	495
Glu Val Asp Pro Glu Phe Leu Ala Lys Met Leu Tyr Asp Pro Leu			
	500	505	510
Arg Val Lys Pro Pro Val Glu Leu Ala Ile His Phe Ser Glu Ile			
	515	520	525
Leu Glu Ile Pro Leu His Pro Tyr Tyr Thr Leu Tyr Trp Asn Thr			
	530	535	540
Val Asn Pro Lys Asp Val Glu Arg Leu Trp Gly Val Leu Lys Asp			
	545	550	555

Lys Ala Thr Ile Glu Trp Gly Thr Phe Arg Gly Ile Lys Phe Ala			
	560	565	570
Lys Lys Ile Glu Ile Ser Leu Asp Asp Leu Gly Ser Leu Lys Arg			
	575	580	585
Thr Leu Glu Leu Leu Gly Leu Pro His Thr Val Arg Glu Gly Ile			
	590	595	600
Val Val Val Asp Tyr Pro Trp Ser Ala Ala Leu Leu Thr Pro Leu			
	605	610	615
Gly Asn Leu Glu Trp Glu Phe Lys Ala Lys Pro Phe Tyr Thr Val			
	620	625	630
Ile Asp Ile Ile Asn Glu Asn Asn Gln Ile Lys Leu Arg Asp Arg			
	635	640	645
Gly Ile Ser Trp Ile Gly Ala Arg Met Gly Arg Pro Glu Lys Ala			
	650	655	660
Lys Glu Arg Lys Met Lys Pro Pro Val Gln Val Leu Phe Pro Ile			
	665	670	675
Gly Leu Ala Gly Gly Ser Ser Arg Asp Ile Lys Lys Ala Ala Glu			
	680	685	690
Glu Gly Lys Ile Ala Glu Val Glu Ile Ala Phe Phe Lys Cys Pro			
	695	700	705
Lys Cys Gly His Val Gly Pro Glu Thr Leu Cys Pro Glu Cys Gly			
	710	715	720
Ile Arg Lys Glu Leu Ile Trp Thr Cys Pro Lys Cys Gly Ala Glu			
	725	730	735
Tyr Thr Asn Ser Gln Ala Glu Gly Tyr Ser Tyr Ser Cys Pro Lys			
	740	745	750

Cys Asn Val Lys Leu Lys Pro Phe Thr Lys Arg Lys Ile Lys Pro			
	755	760	765
Ser Glu Leu Leu Asn Arg Ala Met Glu Asn Val Lys Val Tyr Gly			
	770	775	780
Val Asp Lys Leu Lys Gly Val Met Gly Met Thr Ser Gly Trp Lys			
	785	790	795
Ile Ala Glu Pro Leu Glu Lys Gly Leu Leu Arg Ala Lys Asn Glu			
	800	805	810
Val Tyr Val Phe Lys Asp Gly Thr Ile Arg Phe Asp Ala Thr Asp			
	815	820	825
Ala Pro Ile Thr His Phe Arg Pro Arg Glu Ile Gly Val Ser Val			
	830	835	840
Glu Lys Leu Arg Glu Leu Gly Tyr Thr His Asp Phe Glu Gly Lys			
	845	850	855
Pro Leu Val Ser Glu Asp Gln Ile Val Glu Leu Lys Pro Gln Asp			
	860	865	870
Val Ile Leu Ser Lys Glu Ala Gly Lys Tyr Leu Leu Arg Val Ala			
	875	880	885
Arg Phe Val Asp Asp Leu Leu Glu Lys Phe Tyr Gly Leu Pro Arg			
	890	895	900
Phe Tyr Asn Ala Glu Lys Met Glu Asp Leu Ile Gly His Leu Val			
	905	910	915
Ile Gly Leu Ala Pro His Thr Ser Ala Gly Ile Val Gly Arg Ile			
	920	925	930
Ile Gly Phe Val Asp Ala Leu Val Gly Tyr Ala His Pro Tyr Phe			
	935	940	945

His Ala Ala Lys Arg Arg Asn Cys Asp Gly Asp Glu Asp Ser Val		
950	955	960
Met Leu Leu Leu Asp Ala Leu Leu Asn Phe Ser Arg Tyr Tyr Leu		
965	970	975
Pro Glu Lys Arg Gly Gly Lys Met Asp Ala Pro Leu Val Ile Thr		
980	985	990
Thr Arg Leu Asp Pro Arg Glu Val Asp Ser Glu Val His Asn Met		
995	1000	1005
Asp Val Val Arg Tyr Tyr Pro Leu Glu Phe Tyr Glu Ala Thr Tyr		
1010	1015	1020
Glu Leu Lys Ser Pro Lys Glu Leu Val Arg Val Ile Glu Gly Val		
1025	1030	1035
Glu Asp Arg Leu Gly Lys Pro Glu Met Tyr Tyr Gly Ile Lys Phe		
1040	1045	1050
Thr His Asp Thr Asp Asp Ile Ala Leu Gly Pro Lys Met Ser Leu		
1055	1060	1065
Tyr Lys Gln Leu Gly Asp Met Glu Glu Lys Val Lys Arg Gln Leu		
1070	1075	1080
Thr Leu Ala Glu Arg Ile Arg Ala Val Asp Gln His Tyr Val Ala		
1085	1090	1095
Glu Thr Ile Leu Asn Ser His Leu Ile Pro Asp Leu Arg Gly Asn		
1100	1105	1110
Leu Arg Ser Phe Thr Arg Gln Glu Phe Arg Cys Val Lys Cys Asn		
1115	1120	1125
Thr Lys Tyr Arg Arg Pro Pro Leu Asp Gly Lys Cys Pro Val Cys		
1130	1135	1140

Gly Gly Lys Ile Val Leu Thr Val Ser Lys Gly Ala Ile Glu Lys

1145

1150

1155

Tyr Leu Gly Thr Ala Lys Met Leu Val Ala Asn Tyr Asn Val Lys

1160

1165

1170

Pro Tyr Thr Arg Gln Arg Ile Cys Leu Thr Glu Lys Asp Ile Asp

1175

1180

1185

Ser Leu Phe Glu Tyr Leu Phe Pro Glu Ala Gln Leu Thr Leu Ile

1190

1195

1200

Val Asp Pro Asn Asp Ile Cys Met Lys Met Ile Lys Glu Arg Thr

1205

1210

1215

Gly Glu Thr Val Gln Gly Gly Leu Leu Glu Asn Phe Asn Ser Ser

1220

1225

1230

Gly Asn Asn Gly Lys Lys Ile Glu Lys Lys Glu Lys Lys Ala Lys

1235

1240

1245

Glu Lys Pro Lys Lys Lys Lys Val Ile Ser Leu Asp Asp Phe Phe

1250

1255

1260

Ser Lys Arg

配列番号 : 7

配列の長さ : 20

配列の型 : アミノ酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列 :

Met Asp Lys Glu Gly Phe Leu Asn Lys Val Arg Glu Ala Val Asp

5 10 15
Val Val Lys Leu His
20

配列番号 : 8

配列の長さ : 20

配列の型 : アミノ酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列 :

Met Phe Thr Gly Lys Val Leu Ile Pro Val Lys Val Leu Lys Lys

5 10 15
Phe Glu Asn Trp Asn
20

配列番号 : 9

配列の長さ : 20

配列の型 : アミノ酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列 :

Met Ile Gly Ser Ile Phe Tyr Ser Lys Lys Phe Asn Leu His Arg

5 10 15
Pro Ser Glu Tyr His

20

配列番号 : 1 0

配列の長さ : 2 0

配列の型 : アミノ酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列 :

Met Lys Asp Tyr Arg Pro Leu Leu Gly Ala Ile Lys Val Lys Gly

5

10

15

Asp Asn Val Phe Ser

20

配列番号 : 1 1

配列の長さ : 1 8

配列の型 : アミノ酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列 :

Met Asp Ile Glu Val Leu Arg Arg Leu Leu Glu Arg Glu Leu Ser

5

10

15

Ser Glu His

配列番号 : 1 2

配列の長さ：17

配列の型：アミノ酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列：

Pro Phe Glu Ile Val Phe Glu Gly Ala Lys Glu Phe Ala Gln Leu

5

10

15

Ile Asp

配列番号：13

配列の長さ：17

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列：

ATGGATAARG ARGCGTT

17

配列番号：14

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列：

AATAAAGTWA GRGARGCNGT

20

配列番号：15

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列：

CTCTGCGGCA ATTCTTGCAA

20

配列番号：16

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列：

CTTGCAAAGA AGTATGTAAC

20

配列番号：17

配列の長さ：2009

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

配列:

AAGCTTCCAA AGAACTGGCG TTACGACCCA GAGACTGCAA AGTTGCTCGT CCGCTGATCC 60
TTCCCTATAT TTTCATTTGG TGTTCATTCAT GGATAAGGAG GGTTCATTTGA ACAAGGTTAG 120
GGAGGCTGTG GATGTAGTAA AGCTCCACAT CGAGTTAGGT CATACTATAA GGATAATCTC 180
TCATAGGGAT GCGGATGGAA TAACCTCTGC GGCAATTCTT GCAAAGGCTT TGGGAAGAGA 240
AGGAGCGAGC TTTCACATTT CGATTGTAA ACAGGTAAGT GAAGATCTTT TAAGAGAATT 300
AAAGGATGAA GATTACAAAA TCTTCATTTT TTCCGACCTG GGTAGTGGTT CTTTAAGTTT 360
GATAAAAGAG TATCTTAAGG AAAAACTGT TATAATCCTT GATCACCATC CTCCGGAAAA 420
TGTGAAGTTG GAAGAAAAGC ATATACTTGT TAATCCAGTT CAATTTGGCG CAAATAGCGT 480
TAGGGATCTG AGTGGATCTG GGGTTACATA CTTCTTTGCA AGGGAGCTAA ATGAAAAGAA 540
TAGGGACCTT GCTTACATTG CAATAGTGGG AGCAGTTGGG GATATGCAAG AGAACCATGG 600
AGTTTTCCAT GGGATGAACC TTGATATTAT TGAAGATGGG AAATCTCTGG GAATTCTTGA 660
GGTTAAAAAA GAATTGCGCC TGTTCGGTAG GGAACTAGA CCTCTCTATC AAATGCTCGC 720
ATATGCCACA AATCCGGAAA TTCCTGAAGT TACTGGAGAC GAGAGGAAGG CCATAGAGTG 780
GTAAAGAAC AAGGGCTTCA ATCCGAGAA AAAATATTGG GAATTAAGTG AGGAGGAAAA 840
GAAAAAGTTA CATGATTTCC TAATCATTCA CATGATCAAG CATGGAGCTG GAAAAGAGGA 900
TATAGATAGG CTAATAGGAG ACGTTGTTAT TAGTCCCTTA TATCCTGAAG GGGATCCCAG 960
GCACGAGGCT AGAGAATTTG CTACCCTATT AAACGCTACA GGCAGGTAA ACTTGGGCAA 1020
CTTAGGAGTG GCTGTATGTT TGGGAGATGA GGAGGCTTTC AGAAAGGCC TAAAGATGGT 1080
TGAAGACTAC AAGAGGGAGC AAATTGAAGC AAGAAAGTGG CTAATTCAA ATTGGAACAG 1140
TGAAGTTTGG GAGGGGGATC ATGTTTACGT CTTATATGTG GGAAAGAGTA TTAGAGATAC 1200
TCTCGTTGGA ATAGCAGCTA GCATGGCCAT CAATGCTGGA CTGGCAGATC CTGAAAAGCC 1260
GTTATAGTG TTTGCAGATA CTGATGAAGA TCCAAACCTT CTCAAAGGTT CAGCTAGAAC 1320
AACTGAAAGG GCTTTAGCTA AGGGTTACAA TTTGGGAGAA GCTCTTAGGA AAGCGGCTGA 1380
GCTAGTGAAT GGGGAAGGGG GAGGACACGC GATAGCTGCA GGTATAAGAA TTCCCAGGGC 1440
CAGGTTGGCG GAGTTTAGAA AATTAATAGA TAAAATCCTT GGAGAACAGG TGAGCAAAGG 1500

TGGAGATAAA AGCGAAAGCT GAAATATTGT GGGAGTACAG CGATGAGAAG GTTGCTGAGG 1560
CTATTGCGAA GTCTGTTGAT GTTGATAATA TTTCTCTCCC TCCAAACCTC AAGAAAAGTT 1620
TAAATCTTAT GACGTTTTCC GATGGAGCGA AGGTAATAAC AAAGGTAAA TATCATGGAG 1680
AAATTGAGAC TCTCATAGTT GCTCTCGATG ATTTGATATT CGCTGTAAAA GTTGCTGAGG 1740
AGGTGTTATG ATGGTGNGAA AAGGGNAACA ACAACANGGG ATAAGGGAAG NTGAAGCAAT 1800
GGTATATTAT TTATGCTCCN GANTTCTTGG GCGGGGTAGA GGTAGGATTA ACGCCAGCAG 1860
ACGATCCAGA GAAAGTACTC AACAGAGTCG TTGAAGTTAC TCTGAAGGAT GTTACAGGAG 1920
ACTTTACAAA GAGTCACGTG AAGCTCTATT TCCAAGTATA TGATGTCAAG GGACAGAATG 1980
CCTACACAAA GTTCAAGGGA ATGAAGCTT 2009

配列番号 : 1 8

配列の長さ : 1 4 3 4

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : Genomic DNA

配列 :

ATGGATAAGG AGGGTTTTTT GAACAAGGTT AGGGAGGCTG TGGATGTAGT AAAGCTCCAC 60
ATCGAGTTAG GTCATACTAT AAGGATAATC TCTCATAGGG ATGCGGATGG AATAACCTCT 120
GCGGCAATTC TTGCAAAGGC TTTGGGAAGA GAAGGAGCGA GCTTTCACAT TTCGATTGTT 180
AAACAGGTAA GTGAAGATCT TTTAAGAGAA TTAAAGGATG AAGATTACAA AATCTTCATT 240
TTTTCCGACC TGGGTAGTGG TTCTTTAAGT TTGATAAAAG AGTATCTTAA GGAAAAAACT 300
GTTATAATCC TTGATCACCA TCCTCCGGAA AATGTGAAGT TGAAGAAAA GCATATACTT 360
GTTAATCCAG TTCAATTTGG CGCAAATAGC GTTAGGGATC TGAGTGGATC TGGGGTTACA 420
TACTTCTTTG CAAGGGAGCT AAATGAAAAG AATAGGGACC TTGCTTACAT TGCAATAGTG 480
GGAGCAGTTG GGGATATGCA AGAGAACGAT GGAGTTTTCC ATGGGATGAA CCTTGATATT 540

ATTGAAGATG GGAAATCTCT GGGAATTCTT GAGGTAAAA AAGAATTGCG CCTGTTTGCT 600
 AGGGAAACTA GACCTCTCTA TCAAATGCTC GCATATGCCA CAAATCCGGA AATTCCTGAA 660
 GTTACTGGAG ACGAGAGGAA GGCCATAGAG TGGTTAAAGA ACAAGGGCTT CAATCCCAG 720
 AAAAAATATT GGGAAATTAAG TGAGGAGGAA AAGAAAAAGT TACATGATTT CCTAATCATT 780
 CACATGATCA AGCATGGAGC TGGAAAAGAG GATATAGATA GGCTAATAGG AGACGTTGTT 840
 ATTAGTCCCT TATATCCTGA AGGGGATCCC AGGCACGAGG CTAGAGAATT TGCTACCCTA 900
 TTAAACGCTA CAGGCAGGTT AACTTGGGC AACTTAGGAG TGGCTGTATG TTTGGGAGAT 960
 GAGGAGGCTT TCAGAAAGGC CCTAAAGATG GTTGAAGACT ACAAGAGGGA GCAAATTGAA 1020
 GCAAGAAAGT GGCTACTTCA AAATTGGAAC AGTGAAGTTT GGGAGGGGGA TCATGTTTAC 1080
 GTCTTATATG TGGGAAAGAG TATTAGAGAT ACTCTCGTTG GAATAGCAGC TAGCATGGCC 1140
 ATCAATGCTG GACTGGCAGA TCCTGAAAAG CCGGTTATAG TGTTCGAGA TACTGATGAA 1200
 GATCCAAACC TTCTCAAAGG TTCAGCTAGA ACAACTGAAA GGCCTTTAGC TAAGGGTTAC 1260
 AATTTGGGAG AAGCTCTTAG GAAAGCGGCT GAGCTAGTGA ATGGGGAAGG GGGAGGACAC 1320
 GCGATAGCTG CAGGTATAAG AATCCCAGG GCCAGGTTGG CGGAGTTTAG AAAATTAATA 1380
 GATAAAATCC TTGGAGAACA GGTGAGCAAA GGTGGAGATA AAAGCGAAAG CTGA 1434

配列番号 : 1 9

配列の長さ : 4 7 7

配列の型 : アミノ酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列 :

Met Asp Lys Glu Gly Phe Leu Asn Lys Val Arg Glu Ala Val Asp

5

10

15

Val Val Lys Leu His Ile Glu Leu Gly His Thr Ile Arg Ile Ile

20	25	30
Ser His Arg Asp Ala Asp Gly Ile Thr	Ser Ala Ala Ile Leu Ala	
35	40	45
Lys Ala Leu Gly Arg Glu Gly Ala Ser Phe His Ile Ser Ile Val		
50	55	60
Lys Gln Val Ser Glu Asp Leu Leu Arg Glu Leu Lys Asp Glu Asp		
65	70	75
Tyr Lys Ile Phe Ile Phe Ser Asp Leu Gly Ser Gly Ser Leu Ser		
80	85	90
Leu Ile Lys Glu Tyr Leu Lys Glu Lys Thr Val Ile Ile Leu Asp		
95	100	105
His His Pro Pro Glu Asn Val Lys Leu Glu Glu Lys His Ile Leu		
110	115	120
Val Asn Pro Val Gln Phe Gly Ala Asn Ser Val Arg Asp Leu Ser		
125	130	135
Gly Ser Gly Val Thr Tyr Phe Phe Ala Arg Glu Leu Asn Glu Lys		
140	145	150
Asn Arg Asp Leu Ala Tyr Ile Ala Ile Val Gly Ala Val Gly Asp		
155	160	165
Met Gln Glu Asn Asp Gly Val Phe His Gly Met Asn Leu Asp Ile		
170	175	180
Ile Glu Asp Gly Lys Ser Leu Gly Ile Leu Glu Val Lys Lys Glu		
185	190	195
Leu Arg Leu Phe Gly Arg Glu Thr Arg Pro Leu Tyr Gln Met Leu		
200	205	210
Ala Tyr Ala Thr Asn Pro Glu Ile Pro Glu Val Thr Gly Asp Glu		

215	220	225
Arg Lys Ala Ile Glu Trp Leu Lys Asn Lys Gly Phe Asn Pro Glu		
230	235	240
Lys Lys Tyr Trp Glu Leu Ser Glu Glu Glu Lys Lys Lys Leu His		
245	250	255
Asp Phe Leu Ile Ile His Met Ile Lys His Gly Ala Gly Lys Glu		
260	265	270
Asp Ile Asp Arg Leu Ile Gly Asp Val Val Ile Ser Pro Leu Tyr		
275	280	285
Pro Glu Gly Asp Pro Arg His Glu Ala Arg Glu Phe Ala Thr Leu		
290	295	300
Leu Asn Ala Thr Gly Arg Leu Asn Leu Gly Asn Leu Gly Val Ala		
305	310	315
Val Cys Leu Gly Asp Glu Glu Ala Phe Arg Lys Ala Leu Lys Met		
320	325	330
Val Glu Asp Tyr Lys Arg Glu Gln Ile Glu Ala Arg Lys Trp Leu		
335	340	345
Leu Gln Asn Trp Asn Ser Glu Val Trp Glu Gly Asp His Val Tyr		
350	355	360
Val Leu Tyr Val Gly Lys Ser Ile Arg Asp Thr Leu Val Gly Ile		
365	370	375
Ala Ala Ser Met Ala Ile Asn Ala Gly Leu Ala Asp Pro Glu Lys		
380	385	390
Pro Val Ile Val Phe Ala Asp Thr Asp Glu Asp Pro Asn Leu Leu		
395	400	405
Lys Gly Ser Ala Arg Thr Thr Glu Arg Ala Leu Ala Lys Gly Tyr		

410	415	420
Asn Leu Gly Glu Ala Leu Arg Lys Ala Ala Glu Leu Val Asn Gly		
425	430	435
Glu Gly Gly Gly His Ala Ile Ala Ala Gly Ile Arg Ile Pro Arg		
440	445	450
Ala Arg Leu Ala Glu Phe Arg Lys Leu Ile Asp Lys Ile Leu Gly		
455	460	465
Glu Gln Val Ser Lys Gly Gly Asp Lys Ser Glu Ser		
470	475	

配列番号 : 2 0

配列の長さ : 3 1

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 (合成DNA)

配列 :

TTCATTTGGT GTTTTCATG GATAAGGAGG G 31

配列番号 : 2 1

配列の長さ : 2 3

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 (合成DNA)

配列 :

AAAGTWYTAA TWCCWGTNAA RGT

23

配列番号：2 2

配列の長さ：2 3

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列：

AAAGTWYTAA AAAARTTYGA RAA

23

配列番号：2 3

配列の長さ：2 0

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列：

GATACTGCTA GAAGATTGGA

20

配列番号：2 4

配列の長さ：2 0

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列：

TTCGTACAGT CCCTCTGGTA

20

配列番号：25

配列の長さ：957

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

配列：

```
CTACGAAGCT AAAATTTGAT GTCTCAACTC AAGGACTTTT AGCTTATAAA ATGTGTCAAG 60
TCTTCCCCGA ACTTTCTCCT CCAGTAAGGG TTTTGTACCT CTCAGCAAAG ACAGGAGTAG 120
GATTTGAAGA CCTTGAAACT TTAGCGTATG AACATTATTG TACATGCGGC GACCTCACTT 180
AGATTTTTTA ACCCCTATTT TCTCTAATGT CATTCAAGTA TTGGGGGAGT AATCATGTTC 240
ACGGGTAAGG TATTGATTCC AGTAAAAGTA CTCAAGAAGT TTGAGAATTG GAATGAAGGA 300
GATATGATAC TGCTAGAAGA TTGGAAAGCC AAGGAATTGT GGGAGAGTGG AGTAGTTGAA 360
ATAATCGATG AAGCTGATAA AGTCATAGGA GAGATCGATA GAGTGTTATC AGAAGAAAAG 420
AAAAACCTCC CATTGACTCC AATACCAGAG GGAAGTACG AAAAAGCTGA ATTTTACATC 480
TATTATCTAG AAAAGTACAT CCAAGAGAAG GTCGACAACA TAGAAACAAT ACAAACTAAG 540
GTCACAAAGT TAGCAAATCT AAAGAAGAAG TATAAGACTC TGAAAGAGAT AAGATTTAAA 600
AAGATACTAG AGGCTGTGAG GCTTAGACCA AACAGTATGG AAATTCTAGC GAGATTATCC 660
CCAGCTGAAA AGAGAATATA CCTTGAGATC TCTAAAATAA GGAGAGAGTG GATAGGTGAT 720
TAGCGTGCAC AGGGAGGAGA TGATTGAGAG ATTTGCAAAC TTCCTTAGGG AGTATACAGA 780
CGAAGATGGT AACCCAGTAT ACAGAGGTAA AATAACTGAT TTACTTACAA TAACACCCAA 840
GAGGTCTGTT GCAATAGACT GGATGCACCT AAATTCCTTT GACTCAGAGC TAGAGTCGAC 900
CTGCAGGCAT GCATGCAGGT CGACTCTAGA GGATCCCCGG GTACCGAGCT CGAATTC 957
```

配列番号 : 2 6

配列の長さ : 4 8 9

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : G e n o m i c D N A

配列 :

```
ATGTTACCGG GTAAGGTATT GATTCCAGTA AAAGTACTCA AGAAGTTTGA GAATTGGAAT   60
GAAGGAGATA TGATACTGCT AGAAGATTGG AAAGCCAAGG AATTGTGGGA GAGTGGAGTA  120
GTTGAAATAA TCGATGAAGC TGATAAAGTC ATAGGAGAGA TCGATAGAGT GTTATCAGAA  180
GAAAAGAAAA ACCTCCCATT GACTCCAATA CCAGAGGGAC TGTACGAAAA AGCTGAATTT  240
TACATCTATT ATCTAGAAAA GTACATCCAA GAGAAGGTCG ACAACATAGA AACAAATACAA  300
ACTAAGGTCA CAAAGTTAGC AAATCTAAAG AAGAAGTATA AGACTCTGAA AGAGATAAGA  360
TTTAAAAAGA TACTAGAGGC TGTGAGGCTT AGACCAAACA GTATGGAAAT TCTAGCGAGA  420
TTATCCCCAG CTGAAAAGAG AATATACCTT GAGATCTCTA AAATAAGGAG AGAGTGGATA  480
GGTGATTAG                                     489
```

配列番号 : 2 7

配列の長さ : 1 6 2

配列の型 : アミノ酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列 :

Met Phe Thr Gly Lys Val Leu Ile Pro Val Lys Val Leu Lys Lys

5	10	15
Phe Glu Asn Trp Asn Glu Gly Asp Met Ile Leu Leu Glu Asp Trp		
20	25	30
Lys Ala Lys Glu Leu Trp Glu Ser Gly Val Val Glu Ile Ile Asp		
35	40	45
Glu Ala Asp Lys Val Ile Gly Glu Ile Asp Arg Val Leu Ser Glu		
50	55	60
Glu Lys Lys Asn Leu Pro Leu Thr Pro Ile Pro Glu Gly Leu Tyr		
65	70	75
Glu Lys Ala Glu Phe Tyr Ile Tyr Tyr Leu Glu Lys Tyr Ile Gln		
80	85	90
Glu Lys Val Asp Asn Ile Glu Thr Ile Gln Thr Lys Val Thr Lys		
95	100	105
Leu Ala Asn Leu Lys Lys Lys Tyr Lys Thr Leu Lys Glu Ile Arg		
110	115	120
Phe Lys Lys Ile Leu Glu Ala Val Arg Leu Arg Pro Asn Ser Met		
125	130	135
Glu Ile Leu Ala Arg Leu Ser Pro Ala Glu Lys Arg Ile Tyr Leu		
140	145	150
Glu Ile Ser Lys Ile Arg Arg Glu Trp Ile Gly Asp		
155	160	

配列番号 : 2 8

配列の長さ : 1 7

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列：

ATGAAAGAYT AYAGRCC

17

配列番号：29

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列：

CAAGCWATWA ARGTNAAGGG

20

配列番号：30

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列：

TTCAAGTAAG AGTGAGTTAG

20

配列番号：31

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列：

TAAGTACTCC ACCATTTCCC

20

配列番号：3 2

配列の長さ：1 0 1 2

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

配列：

TCTAGAACAT AGCAGTAAAA CTTTCCTTCT AGTACAACTT CTTCTCCTCT GTAAACTTTC 60
ACATCAACTA TCTTCTTTCT CCCTTGATCC TCCACCACCT GAGCTTTTGC TAAAAGCAGC 120
TCTCCAACCTT TCACCGGCTT TGTAAGCGT ACCTCTGCCT TTCCAAGAAC TACAGTAGGC 180
TCATTTACAG CAAGCATTGC GCGTAATCA GCTAAACCAA ATGTAAAGCC CCCGTGAACT 240
AGCCCCTTCT CATCAACCTT CATCTCGTCA ATGGTTTTCA GTTCCACTTC AGCATACCCC 300
TCTCTTATTA CCCTGGGTTT TCCTACAAGT CTCTCAGATG TCAGATTGTG CGTTTTCTGC 360
TCCATACCAC CACCGAAAAG AATAAGGTTT TTGAAATTTA AAAGCTAAGG GAGGAGTGAT 420
GAAAGACTAT AGGCCACTCC TCCAAGCAAT AAAAGTTAAG GCAGATAATG TTTTTTCAAG 480
TAAGAGTGAG TTAGTTGGTA TTCTAGCCTT TAATTTGGGA ATATTAACAG TTGGTGAGGC 540
AAAAGAACTC ATAGAGGAGG CCATAAAGGA GGAATCATT GAGGAACTC CCGAAGGTCT 600
CATAGTTCAT GAGGATGCCA TAACTGAAAA GGAAAGCAAA AGGGATATAT TCGGGGAAAT 660
GGTGGAGTAC TTAGCGAGAG AACTTGAGCT TAGCGAGATA GAAGTTCTTG AAGAGATAGA 720
AAAAATGAAA GAGAGGTACG GAAATTTGGA TAAAAAATT CTTGCTTACT TATTCGGACT 780

ATCAAAAGGA GTTAACATGG AGAAATTCAA AGAATACTTG GAGGATGAAT GATGCCCAAA 840
ATAGAACCTT TTGAAAAGTA CACTGAGAGA TACGAGGAGT GGTTTGAAAG AATAAATTTG 900
CATACCTCAG TGAGCTTAAT GCCCTGAAAT CTCTTCTTCC TACCAGAGAA TGTGTTGAAG 960
TGGGAATAGG TAGTGAAGG TTTGCGGCTC CCCTGGAAT TAAGATGGGG GT 1012

配列番号 : 3 3

配列の長さ : 4 1 4

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : Genomic DNA

配列 :

ATGAAAGACT ATAGGCCACT CCTCCAAGCA ATAAAAGTTA AGGGAGATAA TGTTTTTTCA 60
AGTAAGAGTG AGTTAGTTGG TATTCTAGCC TTAAATTTGG GAATATTAAC AGTTGGTGAG 120
GCAAAAGAAC TCATAGAGGA GGCCATAAAG GAGGGAATCA TTGAGGAAAC TCCCGAAGGT 180
CTCATAGTTC ATGAGGATGC CATAACTGAA AAGGAAAGCA AAAGGGATAT ATTCGGGGAA 240
ATGGTGGAGT ACTTAGCGAG AGAACTTGAG CTTAGCGAGA TAGAAGTTCT TGAAGAGATA 300
GAAAAAATGA AAGAGAGGTA CGGAAATTTG GATAAAAAAA TTCTTGCTTA CTTATTCGGA 360
CTATCAAAAG GAGTTAACAT GGAGAAATTC AAAGAATACT TGGAGGATGA ATGA 414

配列番号 : 3 4

配列の長さ : 1 3 7

配列の型 : アミノ酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列：

Met	Lys	Asp	Tyr	Arg	Pro	Leu	Leu	Gln	Ala	Ile	Lys	Val	Lys	Gly
						5				10				15
Asp	Asn	Val	Phe	Ser	Ser	Lys	Ser	Glu	Leu	Val	Gly	Ile	Leu	Ala
						20				25				30
Phe	Asn	Leu	Gly	Ile	Leu	Thr	Val	Gly	Glu	Ala	Lys	Glu	Leu	Ile
						35				40				45
Glu	Glu	Ala	Ile	Lys	Glu	Gly	Ile	Ile	Glu	Glu	Thr	Pro	Glu	Gly
						50				55				60
Leu	Ile	Val	His	Glu	Asp	Ala	Ile	Thr	Glu	Lys	Glu	Ser	Lys	Arg
						65				70				75
Asp	Ile	Phe	Gly	Glu	Met	Val	Glu	Tyr	Leu	Ala	Arg	Glu	Leu	Glu
						80				85				90
Leu	Ser	Glu	Ile	Glu	Val	Leu	Glu	Glu	Ile	Glu	Lys	Met	Lys	Glu
						95				100				105
Arg	Tyr	Gly	Asn	Leu	Asp	Lys	Lys	Ile	Leu	Ala	Tyr	Leu	Phe	Gly
						110				115				120
Leu	Ser	Lys	Gly	Val	Asn	Met	Glu	Lys	Phe	Lys	Glu	Tyr	Leu	Glu
						125				130				135

Asp Glu

配列番号：3 5

配列の長さ：3 3

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列：

AAAGCTAAGG GAGGACATAT GAAAGACTAT AGG 33

配列番号：3 6

配列の長さ：3 5

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列：

TCAAACCACT CCTCGAATTC CTCAGTGTAC TTTTC 35

配列番号：3 7

配列の長さ：2 0

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列：

CCWTTYGARA TWGTWTTYGA 20

配列番号：3 8

配列の長さ：2 0

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列：

GGWGCWAARG ARTTYGCNCA

20

配列番号：39

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列：

AACTTATAGA CACCGCAAGT

20

配列番号：40

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列：

GTCACCTCTTC AACTCTTGGA

20

配列番号：41

配列の長さ：989

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

配列：

```
AAGCTTATAA AAGAATACCC GATACAGACA ATGGAAAAAC TTATTTATTG AGGGGTAAAG 60
AAAGAGTTAG GCTTATGCTA AACATTCTTA AGGAGGTGGA AAGAGATGCC ATTTGAAATC 120
GTATTTGAAG GTGCAAAAGA GTTTGCCCAA CTTATAGACA CCGCAAGTAA GTTAATAGAT 180
GAGGCCGCGT TTAAAGTTAC AGAAGATGGG ATAAGCATGA GGGCCATGGA TCCAAGTAGA 240
GTTGTCCTGA TTGACCTAAA TCTCCCGTCA AGCATATTTA GCAAATATGA AGTTGTTGAA 300
CCAGAAACAA TTGGAGTTAA CATGGACCAC CTAAAGAAGA TCCTAAAGAG AGGTAAAGCA 360
AAGGACACCT TAATACTCAA GAAAGGAGAG GAAAACCTCT TAGAGATAAC AATTCAAGGA 420
ACTGCAACAA GAACATTTAG AGTTCCCTA ATAGATGTAG AAGAGATGGA AGTTGACCTC 480
CCAGAACTTC CATTCACTGC AAAGGTTGTA GTTCTTGGAG AAGTCCTAAA AGATGCTGTT 540
AAAGATGCCT CTCTAGTGAG TGACAGCATA AAATTTATTG CCAGGGAAAA TGAATTTATA 600
ATGAAGGCAG AGGGAGAAAC CCAGGAAGTT GAGATAAAGC TAACTCTTGA AGATGAGGGA 660
TTATTGGACA TCGAGGTTC AAGAGGAGACA AAGAGCGCAT ATGGAGTCAG CTATCTCTCC 720
GACATGGTTA AAGGACTTGG AAAGGCCGAT GAAGTTACAA TAAAGTTTGG AAATGAAATG 780
CCCATGCAAA TGGAGTATTA CATTAGAGAT GAAGGAAGAC TTACATTCCT ACTGGCTCCA 840
AGAGTTGAAG AGTGACTTTT CTTTTCCTTA TAATTTAATT TGGGGATAAC AATGGATATT 900
GAGGTTCTCA GAAGATTATT GGAGAGAGAA CTTTCAAGCG AAGAACTGAC TAAATAGAG 960
GAAGAATTTT ATGACGATTT AGAAAGCTT 989
```

配列番号：4 2

配列の長さ：4 5

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列：

CCGGAACCGC CTCCTCAGA GCCGCCACCC TCAGAACCGC CACCC

45

配列番号：4 3

配列の長さ：2 3

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列：

CCWTGGGTWG ARAARTAYAG RCC

23

配列番号：4 4

配列の長さ：2 0

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列：

WSWGATGAAA CAGGNATHGA

20

配列番号：4 5

配列の長さ：2 0

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列：

GCWTTWAGAA GAACNATGGA

20

配列番号：4 6

配列の長さ：2 0

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列：

TTWCCWACWC CWGGWGGNCC

20

配列番号：4 7

配列の長さ：2 0

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列：

CTTCTTAAG CATTYTGNGC

20

配列番号：4 8

配列の長さ：2 3

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列：

ATWATTTTWS WWGGATARTT RCA

23

配列番号：49

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列：

ATWGCTTTTC TCATRTCNC

20

配列番号：50

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列：

ATCTTGAGTT AAAGCGTCGG

20

配列番号：51

配列の長さ : 2 0

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 (合成DNA)

配列 :

ACGTTGCTT TATCTTGAGC

20

配列番号 : 5 2

配列の長さ : 2 0

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 (合成DNA)

配列 :

TCAAAGACTT GACGACATTG

20

配列番号 : 5 3

配列の長さ : 2 0

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 (合成DNA)

配列 :

TTCTGCTATG TAAAGTATTG

20

配列番号 : 5 4

配列の長さ : 2 0

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 (合成DNA)

配列 :

CAATACTTTA CATAGCAGAA

20

配列番号 : 5 5

配列の長さ : 3 6 2 0

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : G e n o m i c DNA

配列 :

GAGCTCCAGC AACAACAATA ACCCAAGATG GAAAGGACTT TGGAGTAAGG TACTTTGGAT 60
TACCGGCAGG TCATGAGTTC GCAGCATTCT TAGAGGACAT TGTGGATGTT AGTAGAGAAG 120
AAACAAACCT TATGGACGAG ACAAACAGG CCATCAGAAA CATAGACCAG GATGTAAGAA 180
TATTGGTGTT TGAAACTCCA ACATGCCCAT ACTGTCCACT TGCCGTTAGA ATGGCTCACA 240
AGTTTGCCAT TGAAAACACA AAAGCTGGGA AAGGTAAGAT ACTTGGGGAT ATGGTCGAGG 300
CCATTGAGTA TCCAGAGTGG GCTGACCAGT ACAATGTAAT GGCAGTACCA AAAATTGTTA 360
TTCAGGTCAA CGGAGAAGAC AGAGTAGAAT TTGAAGGAGC TTATCCAGAG AAAATGTTCT 420
TAGAGAAGTT ACTCTCAGCT CTCAGCTGAT CTA CTGTTTT TCCTTCTTTT CTTCTGTTCT 480
GTTATTGCCT AGGATAAGCT TAATAATACT TTGATACCTT TCTTAGTTTA GGTGTGTGAG 540
AGTATGAGCG AAGAGATTAG AGAAGTTAAG GTTCTAGAAA AACCTGGGT TGAGAAGTAT 600

AGACCTCAAA GACTTGACGA CATTGTAGGA CAAGAGCACA TAGTGAAAAG GCTCAAGCAC 660
TACGTCAAAA CTGGATCAAT GCCCCACCTA CTCTTCGCAG GCCCCCTGG TGTCGGAAAG 720
TGTCTTACTG GAGATACCAA AGTTATAGCT AATGGCCAAC TCTTTGAACT TGGAGAACTT 780
GTTGAAAAGC TTTCTGGGGG GAGATTTGGA CCAACTCCAG TTAAAGGGCT CAAAGTTCTT 840
GGAATAGATG AGGATGGAAG GCTTAGAGAG TTTGAAGTCC AATACGTCTA CAAAGATAGA 900
ACTGATAGGT TGATAAAGAT AAAAATCAC CTTGGCAGGG AGCTTAAAGT AACTCCGTAT 960
CACCCACTTC TAGTGAATAG AGAGAATGGC GAAATAAAGT GGATTAAGGC TGAAGAATC 1020
AAACCTGGCG ACAAGCTTGC AATACCGAGC TTTCTCCAC TTATAACTGG AGAAAATCCC 1080
CTTGACAGAGT GGCTTGTTA CTTTATGGGA AGTGGCTATG CTTATCCAAG TAATTCTGTC 1140
ATCACGTTCA CTAACGAAGA TCCACTCATA AGACAACGCT TTATGGAAGT AACAGAGAAA 1200
CTTTTCCTG ATGCAAAGAT AAGGGAAAGA ATTCACGCTG ATGGAAGTCC AGAAGTTTAT 1260
GTGGTATCTA GGAAAGCTTG GAGCCTTGTA AACTCTATTA GCTTAACATT AATACCCAGG 1320
GAGGGGTGGA AAGGAATTCG TTCTTTCCTT AGGGCATATT CCGACTGCAA TGGTCGGATT 1380
GAAAGTGATG CAATAGTTTT ATCAACCGAT AACAATGATA TGGCCCAGCA GATAGCCTAT 1440
GCTTTAGCCA GCTTTGGAAT AATAGCTAAA ATGGATGGAG AAGATGTTAT TATCTCAGGC 1500
TCGGACAACA TAGAGAGGTT CCTAAATGAG ATTGGCTTTA GCACCCAAAG CAACTTAAA 1560
GAAGCCCAGA AGCTCATTAG AAAAACCAAT GTAAGATCCG ATGGACTAAA GATTAAGTAT 1620
GAGCTAATCT CCTATGTAAG AGACAGGCTT AGGTAAATG TCAATGATAA AAGAAATTTG 1680
AGCTACAGAA ATGCAAAGGA GCTTTCTTGG GAACTCATGA AAGAAATTTA TTATCGCCTT 1740
GAGGAACTGG AGAGACTAAA GAAGGTCTTA TCAGAACCCA TCTTGATCGA CTGGAATGAA 1800
GTAGCAAAGA AGAGTGATGA AGTAATAGAA AAAGCTAAAA TTAGAGCAGA GAAGCTCCTA 1860
GAATACATAA AAGGAGAGAG AAAGCCAAGT TTCAAGGAGT ACATTGAGAT AGCAAAAGTC 1920
CTTGGAATTA ACGTTGAACG TACCATCGAA GCTATGAAGA TCTTTGCAA GAGATACTCA 1980
AGCTATGCCG AGATTGGAAG AAAACTTGGA ACTTGGAATT TCAATGTAAA AACAATTCTT 2040
GAGAGCGACA CAGTGATAA CGTTGAAATC CTTGAAAAGA TAAGGAAAAT TGAGCTTGAG 2100
CTCATAGAGG AAATTCTTTC GGATGGAAAG CTCAAAGAAG GTATAGCATA TCTCATTTTC 2160

CTCTTCCAGA ATGAGCTTTA CTGGGACGAG ATAACTGAAG TAAAAGAGCT TAGGGGAGAC 2220
TTTATAATCT ATGATCTTCA TGTTCTGGC TACCACAACCT TTATTGCTGG GAACATGCCA 2280
ACAGTAGTCC ATAACACTAC AGCGGCTTTG GCCCTTGCAA GAGAGCTTTT CGGCGAAAAC 2340
TGGAGGCATA ACTTCCTCGA GTTGAATGCT TCAGATGAAA GAGGTATAAA CGTAATTAGA 2400
GAGAAAGTTA AGGAGTTTGC GAGAACAAAG CCTATAGGAG GAGCAAGCTT CAAGATAATT 2460
TTCCTTGATG AGGCCGACGC TTAACTCAA GATGCCAAC AAGCCTTAAG AAGAACCATG 2520
GAAATGTTCT CGAGTAACGT TCGCTTTATC TTGAGCTGTA ACTACTCCTC CAAGATAATT 2580
GAACCCATAC AGTCTAGATG TGCAATATTC CGCTTCAGAC CTCTCCGCGA TGAGGATATA 2640
GCGAAGAGAC TAAGGTACAT TGCCGAAAAT GAGGGCTTAG AGCTAACTGA AGAAGGTCTC 2700
CAAGCAATAC TTTACATAGC AGAAGGAGAT ATGAGAAGAG CAATAAACAT TCTGCAAGCT 2760
GCAGCAGCTC TAGACAAGAA GATCACCGAC GAAAACGTAT TCATGGTAGC GAGTAGAGCT 2820
AGACCTGAAG ATATAAGAGA GATGATGCTT CTTGCTCTCA AAGGCAACTT CTTGAAGGCC 2880
AGAGAAAAGC TTAGGGAGAT ACTTCTCAAG CAAGGACTTA GTGGAGAAGA TGTACTAGTT 2940
CAGATGCACA AAGAAGTCTT CAACCTGCCA ATAGAGGAGC CAAAGAAGGT TCTGCTTGCT 3000
GATAAGATAG GAGAGTATAA CTTCAGACTC GTTGAAGGGG CTAATGAAAT AATTCAGCTT 3060
GAAGCACTCT TAGCACAGTT CACCCTAATT GGGAAGAAGT GATGAAGTAT GCCAGAGCTT 3120
NCCTTGGGTA GAAAAATACA GGCCAAAAAA GCTAAGTGAA ATTGTAAACC AAGAAGAGGC 3180
TATAGAGAAA GTTAGAGCGT GGATAGAGAG CTGGTTGCAT GNCCACCCCC TTNAGAAAAA 3240
AGCCGTATTA TTAGCAGGAC CCCCAGGGAG CGGAAAGACA ACCACAGTNT ACGCTNTAGC 3300
AAATGAGTAC AACTTTGAAG TCATTGAGCT CAACGCGAGT GATGAGAGAA CTTATGAAAA 3360
AATCTCCAGG TATGTTCAAG CAGCATACAC TATGGATATC CTCGGAAAGA GGAGGAAGAT 3420
AATCTTCCTC GATGAAGCAG ATAATATAGA GCCCAGCGGA GCTAAGGAAA TCGCAAAACT 3480
AATTGATAAG GCCAAAAATC CAATAATAAT GGCTGCAAAT AAGTACTGGG AAGTTCCAAA 3540
AGAGATCCGA GAAAAAGCTG AGCTAGTAGA GTACAAGAGG TTAACCCAGA GAGATGTAAT 3600
GAATGCCTTA ATAAGGATCC 3620

配列番号 : 5 6

配列の長さ : 2 1

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 (合成DNA)

配列 :

CTTTCCGACA CCAGGGGGGC C

21

配列番号 : 5 7

配列の長さ : 2 1

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 (合成DNA)

配列 :

ACTACAGCGG CTTTGGCCCT T

21

配列番号 : 5 8

配列の長さ : 2 3

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 (合成DNA)

配列 :

GATGAGTTCG TGTCCGTACA ACT

23

配列番号 : 5 9

配列の長さ : 2 2

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 (合成DNA)

配列 :

ACAAAGCCAG CCGGAATATC TG

22

配列番号 : 6 0

配列の長さ : 2 0

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 (合成DNA)

配列 :

GCTTCTAAAT CATTDATNGC

20

配列番号 : 6 1

配列の長さ : 2 0

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 (合成DNA)

配列 :

GCGTGGATAG AGAGCTGGTT

20

配列番号 : 6 2

配列の長さ : 2 0

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 (合成DNA)

配列 :

CTCTGGGTTA ACCTCTTGTA

20

配列番号 : 6 3

配列の長さ : 1 4 3 7

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : Genomic DNA

配列 :

ATGCCAGAGC TTCCCTGGGT AGAAAAATAC AGGCCAAAAA AGTTAAGTGA AATTGTAAAC 60
CAAGAAGAGG CTATAGAGAA AGTTAGAGCG TGGATAGAGA GCTGGTTGCA TGGCCACCCC 120
CCTAAGAAAA AAGCCCTATT ATTAGCAGGA CCCCAGGGA GCGGAAAGAC AACCACAGTC 180
TACGCTCTAG CAAATGAGTA CAACTTTGAA GTCATTGAGC TCAACGCGAG TGATGAGAGA 240
ACTTATGAAA AAATCTCCAG GTATGTTCAA GCAGCATACA CTATGGATAT CCTCGGAAAG 300
AGGAGGAAGA TAATCTTCCT CGATGAAGCA GATAATATAG AGCCCAGCGG AGCTAAGGAA 360
ATCGCAAAAC TAATTGATAA GGCCAAAAAT CCAATAATAA TGGCTGCAAA TAAGTACTGG 420
GAAGTTCCAA AAGAGATCCG AGAAAAAGCT GAGCTAGTAG AGTACAAGAG GTTAACCCAG 480

AGAGATGTAA TGAATGCCTT AATAAGGATC CTAAAGAGGG AAGGTATAAC AGTTCCAAAA 540
GAAATCCTCC TAGAAATAGC AAAAAGATCT AGTGGAGATC TAAGAGCAGC TATAAATGAT 600
CTACAGACCG TTGTAGTGGG TGGTTACGAA GATGCTACGC AAGTTTGGC ATATAGAGAT 660
GTAGAAAAGA CAGTCTTTCA AGCCCTAGGA CTCGTCTTTG GAAGTGACAA CGCCAAGAGG 720
GCAAAGATGG CAATGTGGAA CTGGACATG TCCCCTGATG AATTCCTGCT ATGGGTAGAT 780
GAGAACATTC CTCACCTCTA CCTAAATCCA GAGGAGATTG CCCAGGCGTA TGATGCAATT 840
AGTAGAGCCG ACATATACCT CGGAAGGGCC GCCAGAACTG GAAACTATTC ACTCTGGAAG 900
TACGCAATAG ATATGATGAC TGCAGGAGTT GCCGTGGCAG GGAGAAAGAG AAGGGGATTT 960
GTCAAGTTTT ATCCTCCCAA CACCCTAAAG ATTTTAGCGG AAAGCAAAGA AGAAAGAGAG 1020
ATCAGAGAGT CAATAATTAA AAAGATAATA CGAGAGATGC ACATGAGTAG GCTACAGGCA 1080
ATAGAAACGA TGAAAATAAT TAGAGAGATT TTCGAGAACA ATCTAGACCT TGCTGCGCAC 1140
TTTACAGTGT TCCTTGGTCT GTCTGAAAAA GAAGTTGAGT TTCTAGCTGG AAAGGAAAAA 1200
GCTGGTACCA TTTGGGGCAA AGCCTTAGCA TTAAGAAGGA AACTTAAGGA GCTTGAATA 1260
AGAGAGGAGG AGAAGCCTAA AGTTGAAATT GAAGAAGAGG AAGAAGAGGA AGAAAAGACC 1320
GAAGAAGAAA AAGAGGAAAT AGAAGAAAAA CCCGAAGAAG AGAAAGAAGA GGAGAAGAAA 1380
GAAAAGGAAA AGCCAAAGAA AGGCAAACAA GCAACTCTCT TTGACTTTCT TAAAAAG 1437

配列番号 : 6 4

配列の長さ : 4 7 9

配列の型 : アミノ酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列 :

Met Pro Glu Leu Pro Trp Val Glu Lys Tyr Arg Pro Lys Lys Leu

5

10

15

Ser Glu Ile Val Asn Gln Glu Glu Ala Ile Glu Lys Val Arg Ala			
	20	25	30
Trp Ile Glu Ser Trp Leu His Gly His Pro Pro Lys Lys Lys Ala			
	35	40	45
Leu Leu Leu Ala Gly Pro Pro Gly Ser Gly Lys Thr Thr Thr Val			
	50	55	60
Tyr Ala Leu Ala Asn Glu Tyr Asn Phe Glu Val Ile Glu Leu Asn			
	65	70	75
Ala Ser Asp Glu Arg Thr Tyr Glu Lys Ile Ser Arg Tyr Val Gln			
	80	85	90
Ala Ala Tyr Thr Met Asp Ile Leu Gly Lys Arg Arg Lys Ile Ile			
	95	100	105
Phe Leu Asp Glu Ala Asp Asn Ile Glu Pro Ser Gly Ala Lys Glu			
	110	115	120
Ile Ala Lys Leu Ile Asp Lys Ala Lys Asn Pro Ile Ile Met Ala			
	125	130	135
Ala Asn Lys Tyr Trp Glu Val Pro Lys Glu Ile Arg Glu Lys Ala			
	140	145	150
Glu Leu Val Glu Tyr Lys Arg Leu Thr Gln Arg Asp Val Met Asn			
	155	160	165
Ala Leu Ile Arg Ile Leu Lys Arg Glu Gly Ile Thr Val Pro Lys			
	170	175	180
Glu Ile Leu Leu Glu Ile Ala Lys Arg Ser Ser Gly Asp Leu Arg			
	185	190	195
Ala Ala Ile Asn Asp Leu Gln Thr Val Val Val Gly Gly Tyr Glu			
	200	205	210

Asp Ala Thr Gln Val Leu Ala Tyr Arg Asp Val Glu Lys Thr Val			
	215	220	225
Phe Gln Ala Leu Gly Leu Val Phe Gly Ser Asp Asn Ala Lys Arg			
	230	235	240
Ala Lys Met Ala Met Trp Asn Leu Asp Met Ser Pro Asp Glu Phe			
	245	250	255
Leu Leu Trp Val Asp Glu Asn Ile Pro His Leu Tyr Leu Asn Pro			
	260	265	270
Glu Glu Ile Ala Gln Ala Tyr Asp Ala Ile Ser Arg Ala Asp Ile			
	275	280	285
Tyr Leu Gly Arg Ala Ala Arg Thr Gly Asn Tyr Ser Leu Trp Lys			
	290	295	300
Tyr Ala Ile Asp Met Met Thr Ala Gly Val Ala Val Ala Gly Arg			
	305	310	315
Lys Arg Arg Gly Phe Val Lys Phe Tyr Pro Pro Asn Thr Leu Lys			
	320	325	330
Ile Leu Ala Glu Ser Lys Glu Glu Arg Glu Ile Arg Glu Ser Ile			
	335	340	345
Ile Lys Lys Ile Ile Arg Glu Met His Met Ser Arg Leu Gln Ala			
	350	355	360
Ile Glu Thr Met Lys Ile Ile Arg Glu Ile Phe Glu Asn Asn Leu			
	365	370	375
Asp Leu Ala Ala His Phe Thr Val Phe Leu Gly Leu Ser Glu Lys			
	380	385	390
Glu Val Glu Phe Leu Ala Gly Lys Glu Lys Ala Gly Thr Ile Trp			
	395	400	405

Gly Lys Ala Leu Ala Leu Arg Arg Lys Leu Lys Glu Leu Gly Ile		
	410	415 420
Arg Glu Glu Glu Lys Pro Lys Val Glu Ile Glu Glu Glu Glu Glu		
	425	430 435
Glu Glu Glu Lys Thr Glu Glu Glu Lys Glu Glu Ile Glu Glu Lys		
	440	445 450
Pro Glu Glu Glu Lys Glu Glu Glu Lys Lys Glu Lys Glu Lys Pro		
	455	460 465
Lys Lys Gly Lys Gln Ala Thr Leu Phe Asp Phe Leu Lys Lys		
	470	475

配列番号 : 6 5

配列の長さ : 2 3

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 (合成DNA)

配列 :

ATGGATATWG ARGTDYTNAG RAG

23

配列番号 : 6 6

配列の長さ : 2 0

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 (合成DNA)

配列：

ATWGARGTWY TWAGRAGRYT

20

配列番号：67

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列：

GAGAGAGAAC TTTCAAGCGA

20

配列番号：68

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列：

CTCTAAGAAG ATATGCCTCT

20

配列番号：69

配列の長さ：558

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類 : Genomic DNA

配列 :

```

ATGGATATTG AGGTTCTCAG AAGATTATTG GAGAGAGAAC TTTCAAGCGA AGAACTGACT   60
AAAATAGAGG AAGAATTTTA TGACGATTTA GAAAGCTTTA GAAAAGCCTT GGAAATCAAT  120
GCCGAGAGAC ATGAAGAAAG AGGAGAGGAC ATTCACAAAA AGCTGTATTT AGCTCAACTA  180
TCTTTGGTTA GGAATCTTGT TAGAGAAATA TTAAGGATTA GGTTCATAA GATTGTTGAT  240
ATGGCATTTG AGGGAGTTCC CAGAAATTTA GTTGGAGATG AAAAGAAAAT ATACAAGATA  300
ATAACAGCTT TCATAAATGG AGAACCTCTT GAAATTGAAA CGGCAGGAGA AGAGAGTATT  360
GAAGTTATTG AAGAGGAAAA AGAAACATCT CCTGGGATAA TAGAGGCATA TCTTCTTAGA  420
GTTGATATTC CAAAAATATT GGATGAAAAT TTGAGAGAAT ATGGGCCCTT CAAGGCTGGC  480
GATCTTGTTG TATTGCCGAA GTCTATTGGC AGGGTACTCA TTCAGAGGGA TGCCGCCGAT  540
AAGGTATTGA TACAATTG                                     558

```

配列番号 : 7 0

配列の長さ : 1 8 6

配列の型 : アミノ酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列 :

```

Met Asp Ile Glu Val Leu Arg Arg Leu Leu Glu Arg Glu Leu Ser
      5              10              15
Ser Glu Glu Leu Thr Lys Ile Glu Glu Glu Phe Tyr Asp Asp Leu
      20              25              30
Glu Ser Phe Arg Lys Ala Leu Glu Ile Asn Ala Glu Arg His Glu
      35              40              45

```

Glu Arg Gly Glu Asp Ile His Lys Lys Leu Tyr Leu Ala Gln Leu
50 55 60
Ser Leu Val Arg Asn Leu Val Arg Glu Ile Leu Arg Ile Arg Leu
65 70 75
His Lys Ile Val Asp Met Ala Phe Glu Gly Val Pro Arg Asn Leu
80 85 90
Val Gly Asp Glu Lys Lys Ile Tyr Lys Ile Ile Thr Ala Phe Ile
95 100 105
Asn Gly Glu Pro Leu Glu Ile Glu Thr Ala Gly Glu Glu Ser Ile
110 115 120
Glu Val Ile Glu Glu Glu Lys Glu Thr Ser Pro Gly Ile Ile Glu
125 130 135
Ala Tyr Leu Leu Arg Val Asp Ile Pro Lys Ile Leu Asp Glu Asn
140 145 150
Leu Arg Glu Tyr Gly Pro Phe Lys Ala Gly Asp Leu Val Val Leu
155 160 165
Pro Lys Ser Ile Gly Arg Val Leu Ile Gln Arg Asp Ala Ala Asp
170 175 180
Lys Val Leu Ile Gln Leu
185

配列番号 : 7 1

配列の長さ : 3 3

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列：

TTTAATTTGG GGATAACCAT GGATATTGAG GTT

33

配列番号：7 2

配列の長さ：3 1

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列：

TAGGATGGGT TTTGGATCCT CTCATTGGAG G

31

配列番号：7 3

配列の長さ：2 0

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列：

ATGATWGGWW SWATHTTYTA

20

配列番号：7 4

配列の長さ：2 3

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列：

AAGAAGTTTA ATYTDCAYAG RCC

23

配列番号：7 5

配列の長さ：2 0

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列：

TGAGTATCAT CCAGAGAATC

20

配列番号：7 6

配列の長さ：2 0

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列：

TCACATCGGG ATCGTTCCAG

20

配列番号：7 7

配列の長さ：2 0

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列：

GATTTTGACG CTCATCATGG

20

配列番号：7 8

配列の長さ：2 0

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列：

GGAAAGAACG ATTTTCGAGTC

20

配列番号：7 9

配列の長さ：1 0 0 5

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

配列：

ATGATTGGCT CAATATTTTA TTCCAAGAAG TTTAACCTCC ATAGACCTAG TGAGTATCAT 60

CCAGAGAATC CCAAGAGACT CGAAATCGTT CTTTCCAAGG TCAGAGAGCT TGGACTTGAA 120

GAAAGAATAG AAGAACCAAA CCCAGTTGAA GAGACTTTCG TTGAGAAAAT TCACGACAGG 180

GATTACATCA ACTTCGTAA AGAGGCCGTT GAAAAAGGAA TCACAAGACT TGATCCAGAC 240

ACTTATGTTT CTCCTGGGAC TTGGAGTGC GATTGTTAG CTTTAGGAGC CGCAAGGAGT 300
 GCAGCTTTAT CAGCCCTTCA CTATGGAGGC CTCCACATGG CTCTAGTTAG GCCCCCTGGG 360
 CATCATGCAG GGAGAAGAGG AAGGGCCATG GGTGCCCCAA CACTAGGCTT CTGCATCTTC 420
 AACAACGCGG CCTCTGCACT TGTCACCTTG AAAGAAGAGG GAGTTGAAA AGTTGTTGTA 480
 ATAGATTTTG ACGCTCATCA TGGAAACGGG ACTCAGGAAA TATTCTGGAA CGATCCCGAT 540
 GTGATTCACA TAGATCTACA CGAGAGAGAC ATCTACCCAG GGAGTGGGGA TGTGAGTGAA 600
 GTTGGAGGGT CAAATGCTTA TGGGAGCAAG ATAAACCTCC CAATGCCCCA CTATTCTGGG 660
 GATGGGGATT ACATATATGT TTGGGACGAA ATTGTGCTTC CAATAGTTGA AGAAGTTAAG 720
 CCAAAGGTCA TCGTAATTTT CGCGGGCTTT GATGGATTTA AAGGGGATGG TCTAACAACA 780
 TTAAGGCTCA CAGAAAGTTT TTAATCTTAT GCAGGGGCTA CATTAAATAA ATATCCCTTG 840
 GCATTTATAT TGGAAGGCGG GTATGGAGTA GGGTTAGATA AAGGTTTTCC GGCCTTCATA 900
 ATGGGCTACG AAGAGGGTAA AGCGAAAGCT CGAGAAGAGC CAAGATATGA GACCCTAAAG 960
 TTGGCGGAGG AGGTTAAGGA CATCTTGAGT CCCTGGTGGT CGTTA 1005

配列番号 : 8 0

配列の長さ : 3 3 5

配列の型 : アミノ酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列 :

Met Ile Gly Ser Ile Phe Tyr Ser Lys Lys Phe Asn Leu His Arg

5

10

15

Pro Ser Glu Tyr His Pro Glu Asn Pro Lys Arg Leu Glu Ile Val

20

25

30

Leu Ser Lys Val Arg Glu Leu Gly Leu Glu Glu Arg Ile Glu Glu

35	40	45
Pro Asn Pro Val Glu Glu Thr Phe Val Glu Lys Ile His Asp Arg		
50	55	60
Asp Tyr Ile Asn Phe Val Lys Glu Ala Val Glu Lys Gly Ile Thr		
65	70	75
Arg Leu Asp Pro Asp Thr Tyr Val Ser Pro Gly Thr Trp Ser Ala		
80	85	90
Ala Leu Leu Ala Leu Gly Ala Ala Arg Ser Ala Ala Leu Ser Ala		
95	100	105
Leu His Tyr Gly Gly Leu His Met Ala Leu Val Arg Pro Pro Gly		
110	115	120
His His Ala Gly Arg Arg Gly Arg Ala Met Gly Ala Pro Thr Leu		
125	130	135
Gly Phe Cys Ile Phe Asn Asn Ala Ala Ser Ala Val Val Thr Leu		
140	145	150
Lys Glu Glu Gly Val Gly Lys Val Val Val Ile Asp Phe Asp Ala		
155	160	165
His His Gly Asn Gly Thr Gln Glu Ile Phe Trp Asn Asp Pro Asp		
170	175	180
Val Ile His Ile Asp Leu His Glu Arg Asp Ile Tyr Pro Gly Ser		
185	190	195
Gly Asp Val Ser Glu Val Gly Gly Ser Asn Ala Tyr Gly Ser Lys		
200	205	210
Ile Asn Leu Pro Met Pro His Tyr Ser Gly Asp Gly Asp Tyr Ile		
215	220	225
Tyr Val Trp Asp Glu Ile Val Leu Pro Ile Val Glu Glu Val Lys		

230	235	240
Pro Lys Val Ile Val Ile Ser Ala Gly Phe Asp Gly Phe Lys Gly		
245	250	255
Asp Gly Leu Thr Thr Leu Arg Leu Thr Glu Ser Phe Tyr Ser Tyr		
260	265	270
Ala Gly Ala Thr Leu Asn Lys Tyr Pro Leu Ala Phe Ile Leu Glu		
275	280	285
Gly Gly Tyr Gly Val Gly Leu Asp Lys Gly Phe Pro Ala Phe Ile		
290	295	300
Met Gly Tyr Glu Glu Gly Lys Ala Lys Ala Arg Glu Glu Pro Arg		
305	310	315
Tyr Glu Thr Leu Lys Leu Ala Glu Glu Val Lys Asp Ile Leu Ser		
320	325	330
Pro Trp Trp Ser Leu		
335		

配列番号 : 8 1

配列の長さ : 3 6

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 (合成DNA)

配列 :

GGGAAGAAGT GATGACATAT GCCAGAGCTT CCCTGG

36

配列番号 : 8 2

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列：

TTCCAAGCTC CTTAAGTTTC

20

配列番号：83

配列の長さ：3574

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列：

CATATGCCAG AGCTTCCTG GGTAGAAAAA TACAGGCCAA AAAAGTTAAG TGAAATTGTA 60
AACCAAGAAG AGGCTATAGA GAAAGTTAGA GCGTGGATAG AGAGCTGGTT GCATGGCCAC 120
CCCCCTAAGA AAAAAGCCCT ATTATTAGCA GGACCCCCAG GGAGCGGAAA GACAACCACA 180
GTCTACGCTC TAGCAATGA GTACAACTTT GAAGTCATTG AGCTCAACGC GAGTGATGAG 240
AGAACTTATG AAAAAATCTC CAGGTATGTT CAAGCAGCAT AACTATGGA TATCCTCGGA 300
AAGAGGAGGA AGATAATCTT CCTCGATGAA GCAGATAATA TAGAGCCCAG CGGAGCTAAG 360
GAAATCGCAA AACTAATTGA TAAGGCCAAA AATCCAATAA TAATGGCTGC AAATAAGTAC 420
TGGGAAGTTC CAAAAGAGAT CCGAGAAAAA GCTGAGCTAG TAGAGTACAA GAGGTAAACC 480
CAGAGAGATG TAATGAATGC CTTAATAAGG ATCCTAAAGA GGGAAGGTAT AACAGTTCCA 540
AAAGAAATCC TCCTAGAAAT AGCAAAAAGA TCTAGTGGAG ATCTAAGAGC AGCTATAAAT 600
GATCTACAGA CCGTTGTAGT GGGTGGTTAC GAAGATGCTA CGCAAGTTTT GGCATATAGA 660

GATGTAGAAA AGACAGTCTT TCAAGCCCTA GGA CTCTGTCT TTGGAAGTGA CAACGCCAAG 720
AGGGCAAAGA TGGCAATGTG GAACTTGGAC ATGTCCCCTG ATGAATTCCT GCTATGGGTA 780
GATGAGAACA TTCCTCACCT CTACCTAAAT CCAGAGGAGA TTGCCCAGGC GTATGATGCA 840
ATTAGTAGAG CCGACATATA CCTCGGAAGG GCCGCCAGAA CTGGAAACTA TTCACTCTGG 900
AAGTACGCAA TAGATATGAT GACTGCAGGA GTTGCCGTGG CAGGGAGAAA GAGAAGGGGA 960
TTTGTCAAGT TTTATCCTCC CAACACCCTA AAGATTTTAG CGGAAAGCAA AGAAGAAAGA 1020
GAGATCAGAG AGTCAATAAT TAAAAAGATA ATACGAGAGA TGCACATGAG TAGGCTACAG 1080
GCAATAGAAA CGATGAAAAT AATTAGAGAG ATTTTCGAGA ACAATCTAGA CCTTGCTGCG 1140
CACTTTACAG TGTTCCTTGG TCTGTCTGAA AAAGAAGTTG AGTTTCTAGC TGGAAAGGAA 1200
AAAGCTGGTA CCATTG GGG CAAAGCCTTA GCATTAAGAA GGAACTTAA GGAGCTTGA 1260
ATAAGAGAGG AGGAGAAGCC TAAAGTTGAA ATTGAAGAAG AGGAAGAAGA GGAAGAAAAG 1320
ACCGAAGAAG AAAAAGAGGA AATAGAAGAA AAACCCGAAG AAGAGAAAGA AGAGGAGAAG 1380
AAAGAAAAGG AAAAGCCAAA GAAAGGCAAA CAAGCAACTC TCTTTGACTT TCTTAAAAAG 1440
TGATTACCCT TTTTCTTCTA TTAGAGCTCC GAATAAAGTT GGCCCTCTAA TTTTCTAT 1500
TGTCTCCTCC ACATTAATCT TTACGAATTC GAGCTCCAGC AACACAATA ACCCAAGATG 1560
GAAAGGACTT TGGAGTAAGG TACTTTGGAT TACCGGCAGG TCATGAGTTC GCAGCATTCT 1620
TAGAGGACAT TGTGGATGTT AGTAGAGAAG AAACAAACCT TATGGACGAG ACAAACAGG 1680
CCATCAGAAA CATAGACCAG GATGTAAGAA TATTGGTGTT TGAAACTCCA ACATGCCCAT 1740
ACTGTCCACT TGCCGTTAGA ATGGCTCACA AGTTTGCCAT TGAAACACA AAAGCTGGGA 1800
AAGGTAAGAT ACTTGGGGAT ATGGTCGAGG CCATTGAGTA TCCAGAGTGG GCTGACCACT 1860
ACAATGTAAT GGCAGTACCA AAAATTGTTA TTCAGGTCAA CGGAGAAGAC AGAGTAGAAT 1920
TTGAAGGAGC TTATCCAGAG AAAATGTTCT TAGAGAAGTT ACTCTCAGCT CTCAGCTGAT 1980
CTACTGTTTT TCCTTCTTTT CTTCTGTTCT GTTATTGCCT AGGATAAGCT TAATAATACT 2040
TTGATACCTT TCTTAGTTTA GGTGTGTGAG AGTATGAGCG AAGAGATTAG AGAAGTTAAG 2100
GTTCTAGAAA AACCTGGGT TGAGAAGTAT AGACCTCAA GACTTGACGA CATTGTAGGA 2160
CAAGAGCACA TAGTGAAAAG GCTCAAGCAC TACGTCAAAA CTGGATCAAT GCCCCACCTA 2220

CTCTTCGCAG GCCCCCTGG TGTCGGAAAG ACTACAGCGG CTTTGGCCCT TGCAAGAGAG 2280
CTTTTCGGCG AAAACTGGAG GCATAACTTC CTCGAGTTGA ATGCTTCAGA TGAAAGAGGT 2340
ATAAACGTAA TTAGAGAGAA AGTTAAGGAG TTTGCGAGAA CAAAGCCTAT AGGAGGAGCA 2400
AGCTTCAAGA TAATTTTCCT TGATGAGGCC GACGCTTTAA CTCAAGATGC CCAACAAGCC 2460
TTAAGAAGAA CCATGGAAAT GTTCTCGAGT AACGTTCGCT TTATCTTGAG CTGTA ACTAC 2520
TCCTCCAAGA TAATTGAACC CATACTAGTCT AGATGTGCAA TATTCCGCTT CAGACCTCTC 2580
CGCGATGAGG ATATAGCGAA GAGACTAAGG TACATTGCCG AAAATGAGGG CTTAGAGCTA 2640
ACTGAAGAAG GTCTCCAAGC AATACTTTAC ATAGCAGAAG GAGATATGAG AAGAGCAATA 2700
AACATTCTGC AAGCTGCAGC AGCTCTAGAC AAGAAGATCA CCGACGAAAA CGTATTCATG 2760
GTAGCGAGTA GAGCTAGACC TGAAGATATA AGAGAGATGA TGCTTCTTGC TCTCAAAGGC 2820
AACTTCTTGA AGGCCAGAGA AAAGCTTAGG GAGATACTTC TCAAGCAAGG ACTTAGTGGA 2880
GAAGATGTAC TAGTTCAGAT GCACAAAGAA GTCTTCAACC TGCCAATAGA GGAGCCAAAG 2940
AAGGTTCTGC TTGCTGATAA GATAGGAGAG TATAACTTCA GACTCGTTGA AGGGGCTAAT 3000
GAAATAATTC AGCTTGAAGC ACTCTTAGCA CAGTTCACCC TAATTGGGAA GAAGTGATGA 3060
AGTATGCCAG AGCTTCCCTG GGTAGAAAAA TACAGGCCAA AAAAGTTAAG TGAAATTGTA 3120
AACCAAGAAG AGGCTATAGA GAAAGTTAGA GCGTGGATAG AGAGCTGGTT GCATGGCCAC 3180
CCCCCTAAGA AAAAAGCCGT ATTATTAGCA GGACCCCCAG GGAGCGGAAA GACAACCACA 3240
GTCTACGCTC TAGCAAATGA GTACAACTTT GAAGTCATTG AGCTCAACGC GAGTGATGAG 3300
AGAACTTATG AAAAAATCTC CAGGTATGTT CAAGCAGCAT AACTATGGA TATCCTCGGA 3360
AAGAGGAGGA AGATAATCTT CCTCGATGAA GCAGATAATA TAGAGCCCAG CGGAGCTAAG 3420
GAAATCGCAA AACTAATTGA TAAGGCCAAA AATCCAATAA TAATGGCTGC AAATAAGTAC 3480
TGGGAAGTTC CAAAAGAGAT CCGAGAAAAA GCTGAGCTAG TAGAGTACAA GAGGTAAACC 3540
CAGAGAGATG TAATGAATGC CTTAATAAGG ATCC 3574

配列番号 : 8 4

配列の長さ : 3 3

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列：

TACTTGTAAT ATTTCATAT GATTGGCTCA ATA 33

配列番号：8 5

配列の長さ：3 5

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列：

GATGAGTTTCG TGTCCGTACA ACTGGCGTAA TCATG 35

配列番号：8 6

配列の長さ：2 5

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列：

GGTTATCGAA ATCAGCCACA GCGCC 25

配列番号：8 7

配列の長さ：23

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列：

GCGTACCTTT GTCTACGGG CAA

23

配列番号：88

配列の長さ：22

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列：

GATAGCTGTC GTCATAGGAC TC

22

配列番号：89

配列の長さ：23

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列：

CTTAACCAGT GCGCTGAGTG ACT

23

配列番号 : 9 0

配列の長さ : 2 8

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 (合成DNA)

配列 :

GACAATCTGG AATACGCCAC CTGACTTG 28

配列番号 : 9 1

配列の長さ : 2 8

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 (合成DNA)

配列 :

TTGCCACTTC CGTCAACCAG GCTTATCA 28

配列番号 : 9 2

配列の長さ : 2 9

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 (合成DNA)

配列 :

TGTCCGTCAG CTCATAACGG TACTTCACG 29

請求の範囲

1. DNAポリメラーゼの有するDNA合成活性を促進する耐熱性のDNAポリメラーゼ関連因子。
2. DNAポリメラーゼに結合する活性をさらに有する請求項1記載のDNAポリメラーゼ関連因子。
3. 配列表の配列番号：5又は6に示されるアミノ酸配列を有するDNAポリメラーゼ構成タンパク質を含有するDNAポリメラーゼに結合する活性を有する請求項2記載のDNAポリメラーゼ関連因子。
4. 配列表の配列番号：1、3、19、27、34、64、70及び80からなる群より選択された少なくとも1種のアミノ酸配列、又は該アミノ酸配列において、1個以上のアミノ酸が置換、欠失、付加又は挿入されたアミノ酸配列を含有してなる請求項1～3いずれか記載のDNAポリメラーゼ関連因子。
5. 配列表の配列番号：1、3、19、27、34、64、70及び80からなる群より選択された少なくとも1種のアミノ酸配列、又は該アミノ酸配列において、1個以上のアミノ酸が置換、欠失、付加若しくは挿入されたアミノ酸配列を含有し、DNAポリメラーゼの有するDNA合成活性を促進する活性を有するDNAポリメラーゼ関連因子をコードする遺伝子。
6. 配列表の配列番号：2、4、18、26、33、63、69及び79からなる群より選択された塩基配列、又は該塩基配列において、1個以上の塩基が置換、欠失、付加若しくは挿入された塩基配列を含有してなる請求項5記載の遺伝

子。

7. 請求項5又は6記載の遺伝子とハイブリダイズし、かつDNAポリメラーゼの有するDNA合成活性を促進する活性を有するDNAポリメラーゼ関連因子をコードする遺伝子。

8. 請求項5～7いずれか記載の遺伝子を含有させた形質転換体を培養し、該培養物からDNAポリメラーゼの有するDNA合成活性を促進する耐熱性のDNAポリメラーゼ関連因子を採取する工程を含むことを特徴とする、DNAポリメラーゼ関連因子の製造方法。

9. 請求項1～4いずれか記載のDNAポリメラーゼ関連因子の存在下にDNAを合成することを特徴とする、DNAポリメラーゼを使用するDNAの合成方法。

10. 2種以上のDNAポリメラーゼ関連因子の存在下にDNAを合成する請求項9記載のDNAの合成方法。

11. DNAポリメラーゼ関連因子として、F7、PFU-RFC及びPFU-RFCLSの存在下にDNAの合成を行なう請求項10記載のDNA合成方法。

12. DNAポリメラーゼが、耐熱性DNAポリメラーゼである請求項9～11いずれか記載のDNAの合成方法。

13. PCR法により実施される請求項12記載のDNAの合成方法。

14. 試験管内DNA合成に使用されるキットであって、請求項1～4いずれか記載のDNAポリメラーゼ関連因子及びDNAポリメラーゼを含有してなるキット。

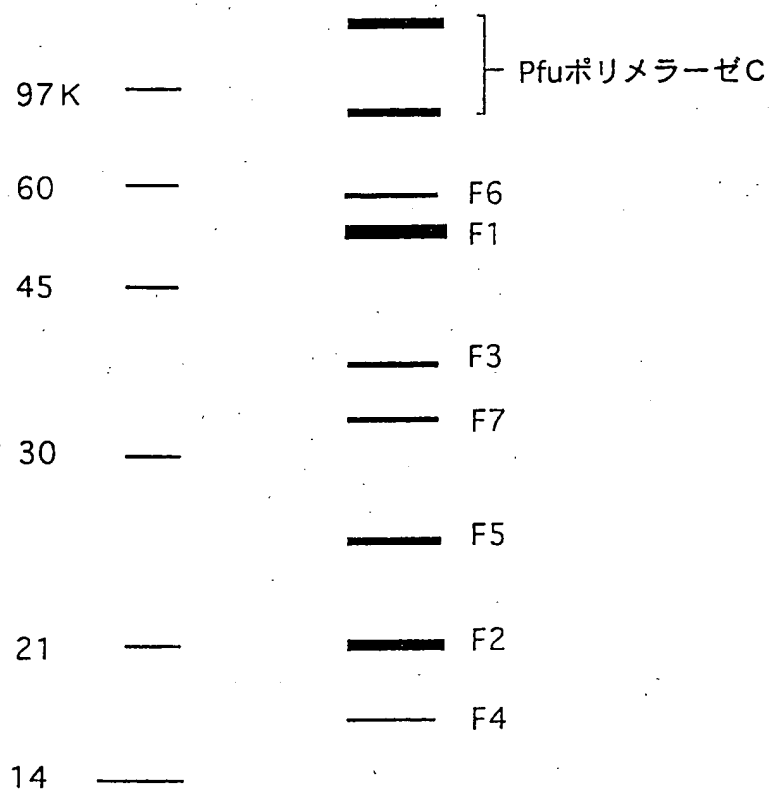
15. さらにDNA合成反応に必要な試薬を含有してなる請求項14記載のキット。

16. 2種以上のDNAポリメラーゼ関連因子を含有してなる請求項14又は15記載のキット。

17. DNAポリメラーゼ関連因子として、F7、PFU-RFC及びPFU-RFCLSを含有してなる請求項16記載のキット。

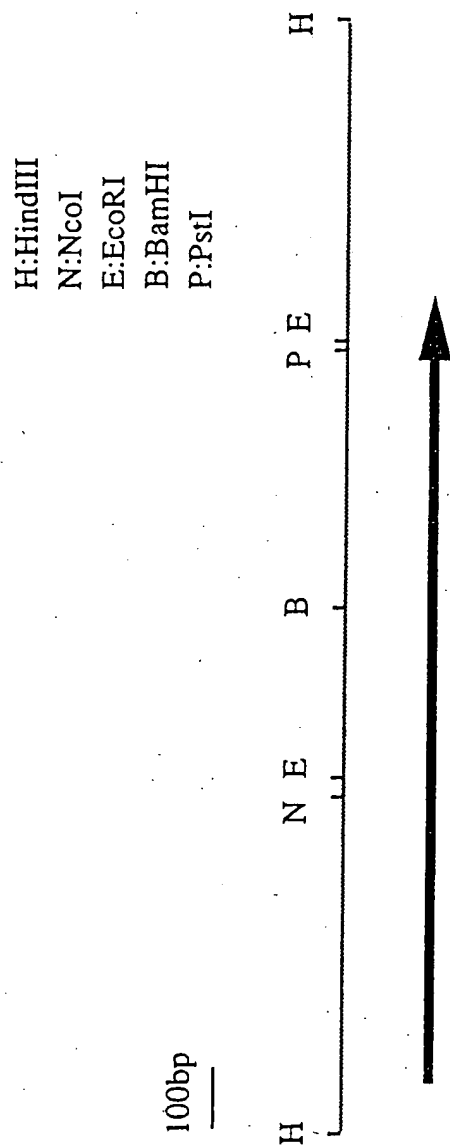
18. DNAポリメラーゼとして、耐熱性DNAポリメラーゼを含有してなる請求項14～17いずれか記載のキット。

分子量マーカー

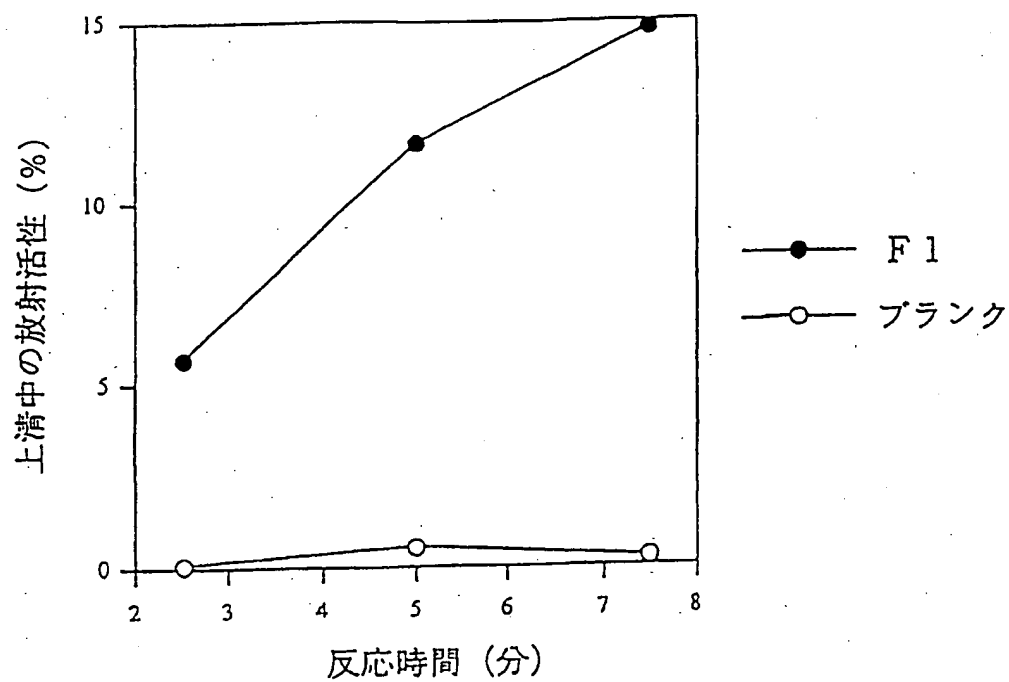


第 1 図

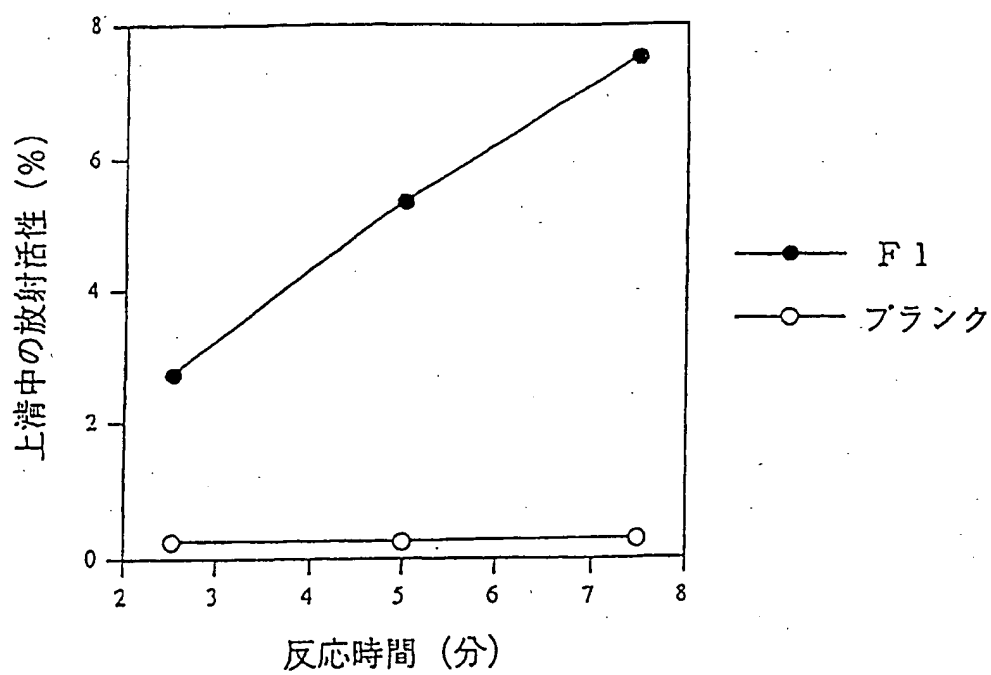
1 / 17



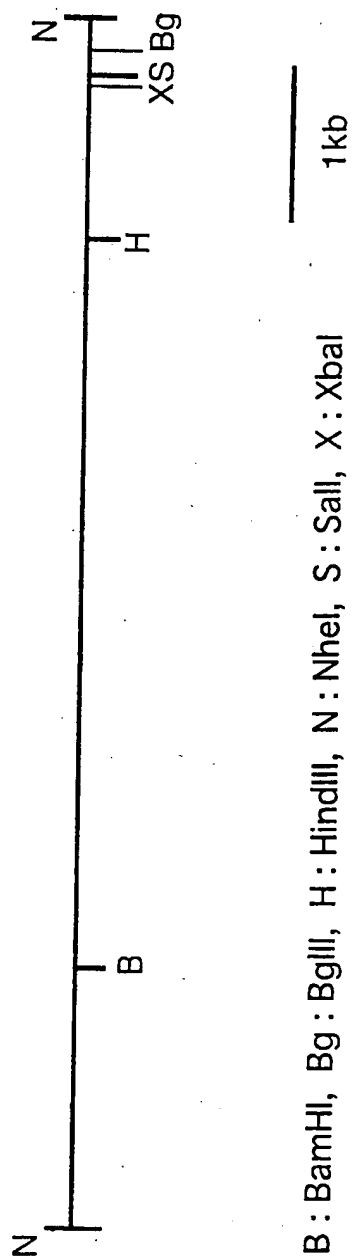
第 2 図



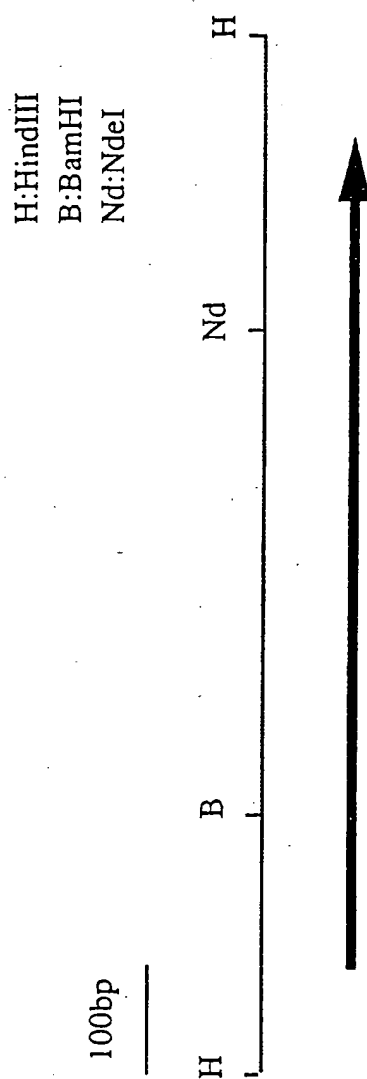
第 3 図



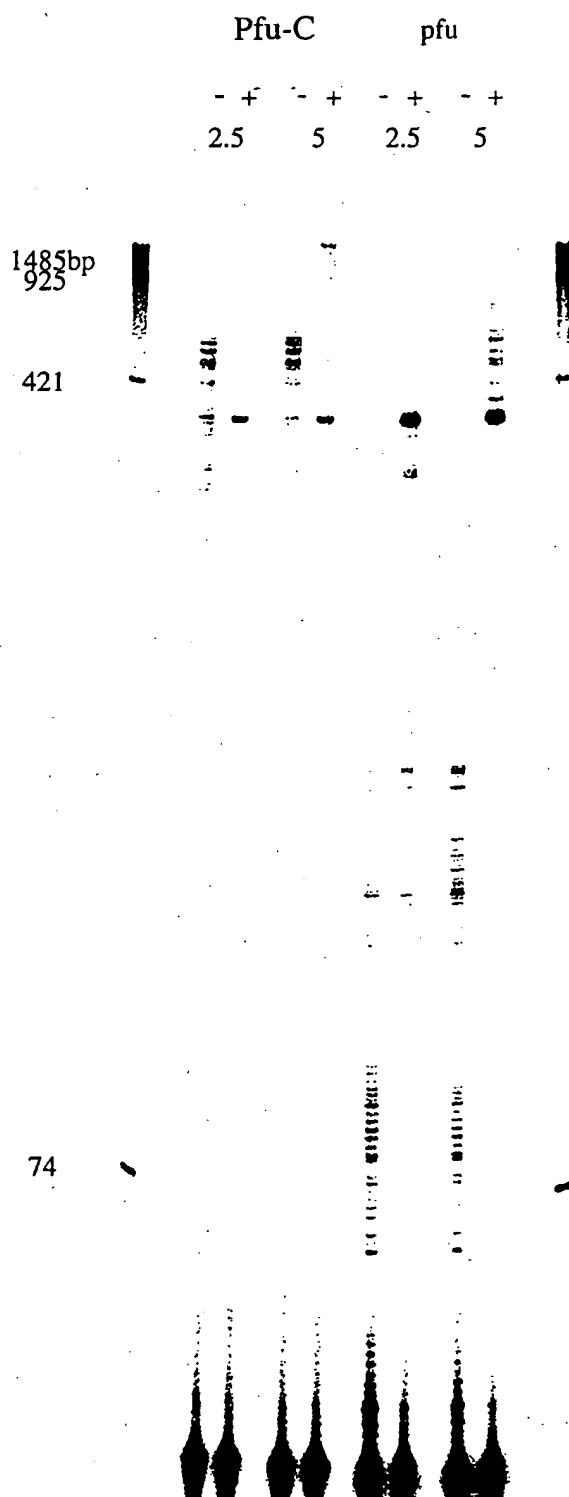
第 4 図



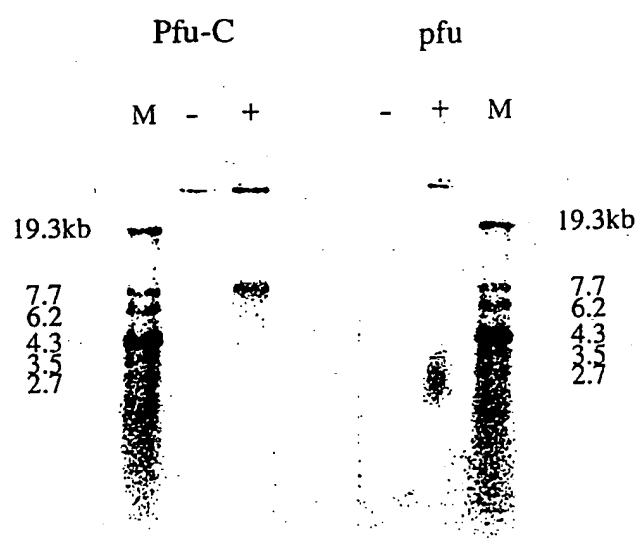
第 5 図



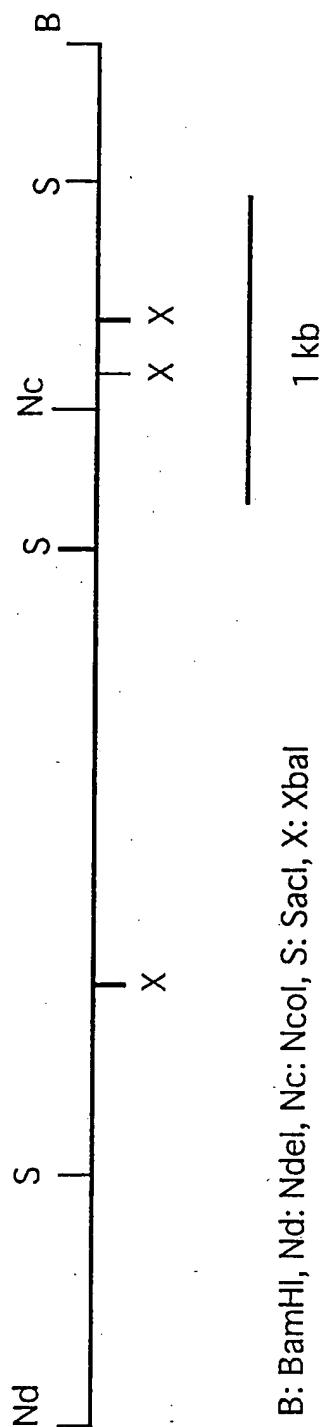
第 6 図



第 7 図



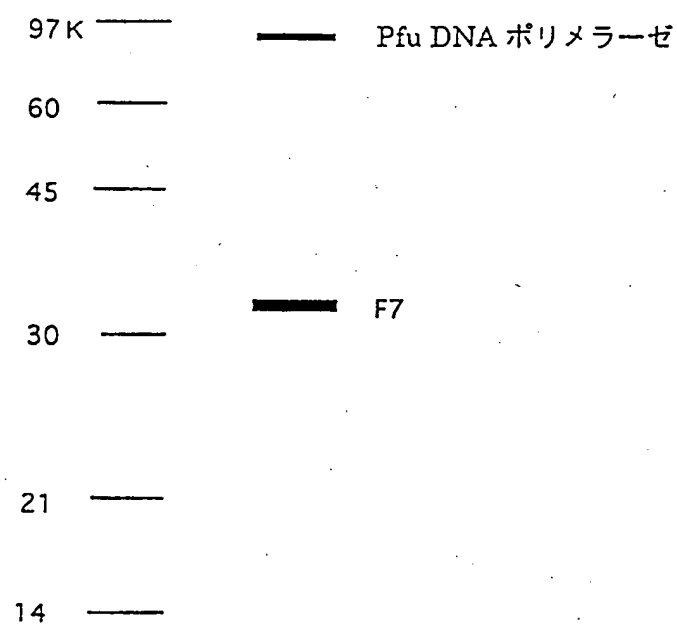
第 8 図



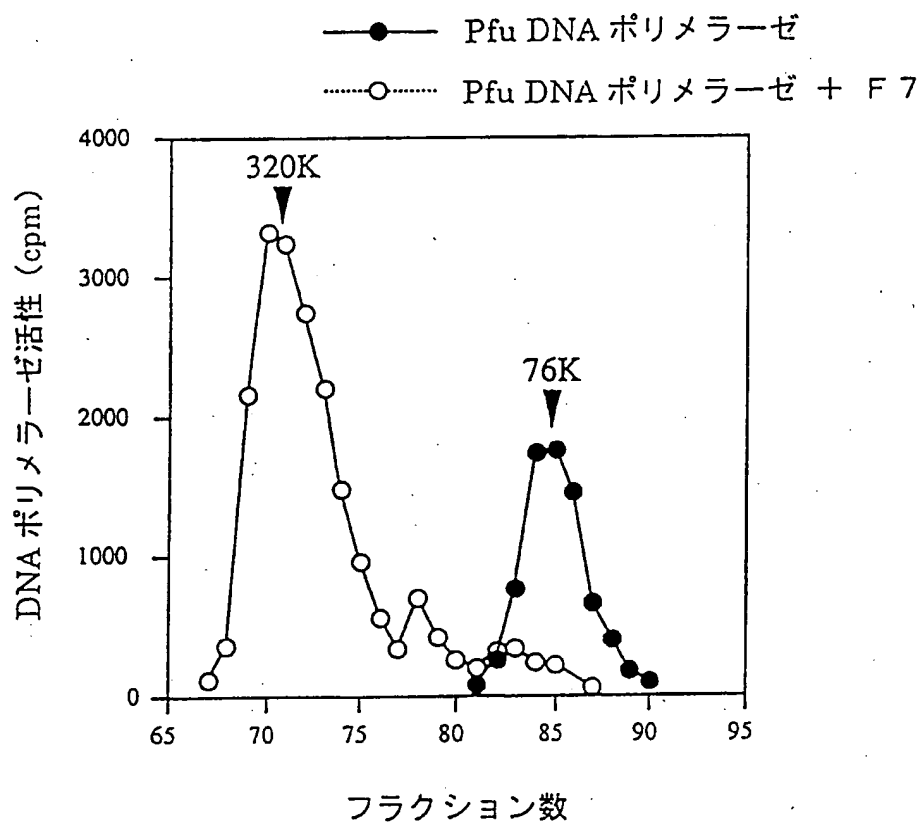
B: BamHI, Nd: NdeI, Nc: NcoI, S: SacI, X: XbaI

第 9 図

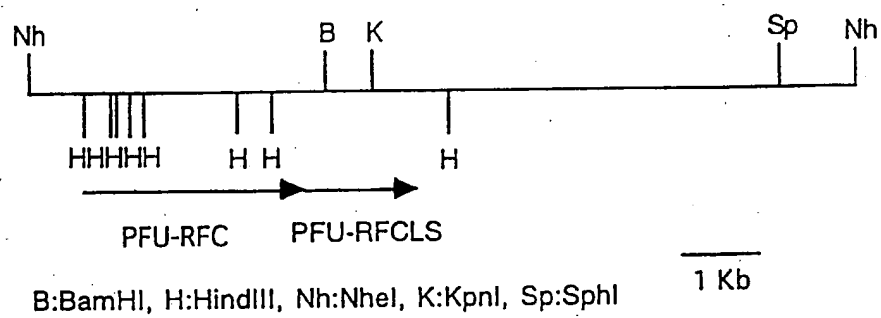
分子量マーカー



第 1 0 図

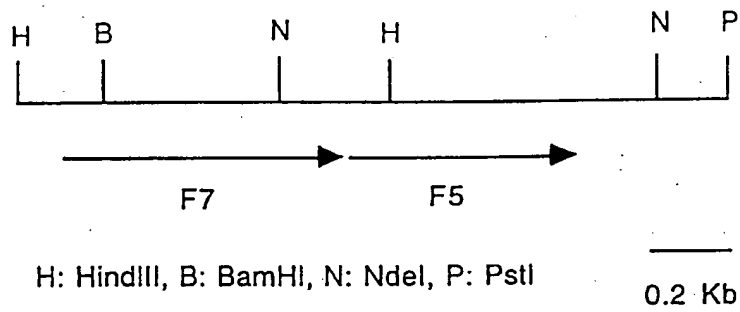


第 1 1 図



第 1 2 図

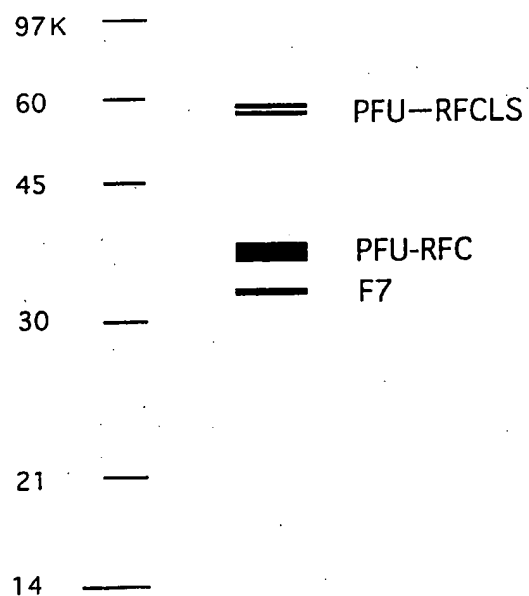
12 / 17



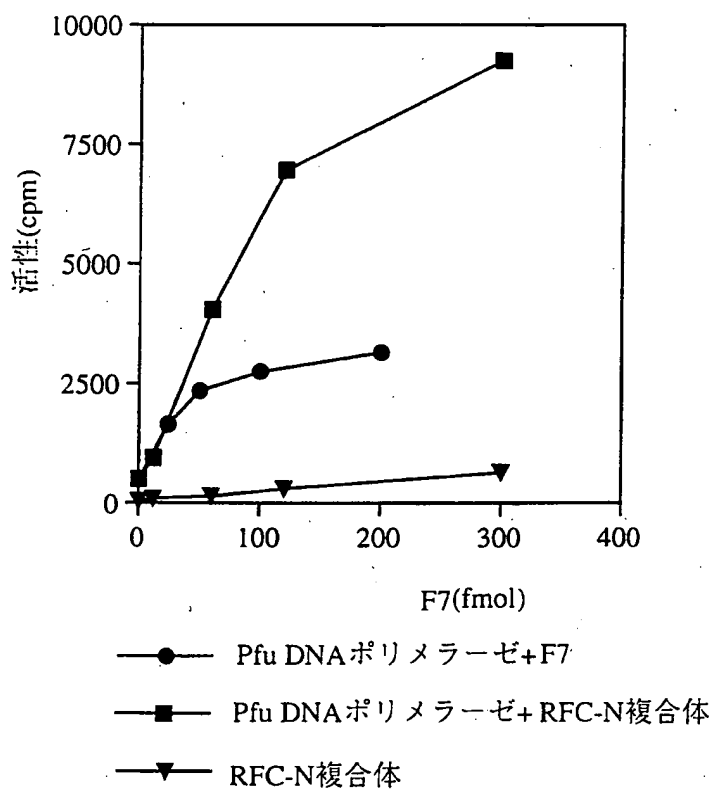
第 1 3 図

13 / 17

分子量マーカー



第 1 4 図



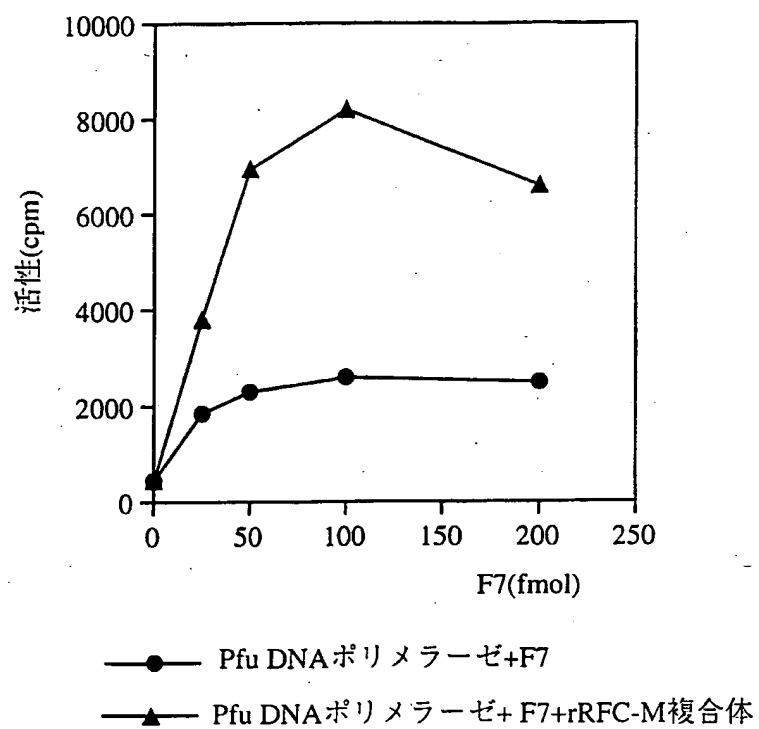
第 1 5 図

pRFC10 制限酵素地図



N: NdeI, B: BamHI, E: EcoRI, K: KpnI, P: PstI

0.5 kb



第 1 7 図

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/02845

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int.Cl ⁶ C12N15/54, C12N9/12, C12N15/31, C07K14/195, C12P21/02 // (C12N15/54, C12R1:01) (C12N9/12, C12R1:19) (C12N15/31, C12R1:01) According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl ⁶ C12N15/54, C12N9/12, C12N15/31, C07K14/195, C12P21/02 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX /PA	JP, 10-84954, A (The Institute of Physical and Chemical Research), 7 April, 1998 (07. 04. 98) & EP, 821058, A2	1, 9-10, 12-16, 18 /2-8, 11, 17
A	The Journal of Japanese Biochemical Society Vol. 68, No. 9 (1996) Hiroshi Morioka "Structure and function of proliferating cell nuclear antigen (PCNA)" p.1542-1548	1-18
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 25 September, 1998 (25. 09. 98)		Date of mailing of the international search report 6 October, 1998 (06. 10. 98)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/02845

A. (Continuation) CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

(C12P21/02, C12R1:19)

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl ⁶ C12N15/54, C12N9/12, C12N15/31, C07K 14/195, C12P21/02// (C12N15/54, C12R1:01) (C12N9/12, C12R1:19) (C12N15/31, C12R1:01) (C12P21/02, C12R1:19)		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl ⁶ C12N15/54, C12N9/12, C12N15/31, C07K 14/195, C12P21/02		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) Genbank/EMBL/DBJ/GeneSeq, WPI(DIALOG), BIOSIS(DIALOG)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P X / P A	JP, 10-84954, A (理化学研究所) 7.4月. 1998 (07.04.98) & EP, 8210 58, A2	1, 9-10, 12- 16, 18 /2-8, 11, 17
A	生化学. vol.68 No.9 (1996) Hiroshi Morioka 「Structure and function of proliferating cell nuclear antigen (PCNA)」 p.1542-1548	1-18
<input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 25.09.98	国際調査報告の発送日 06.10.98	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 小暮 道明 電話番号 03-3581-1101 内線 3449	

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.